

발간등록번호

11-1543000-000181-01

나노전분캡슐화에 의한  
세라마이드의 수용화 및 제품화

(Water Solubilization and Product Development of Ceramide  
using Nanoencapsulation with Starch)

(주) 뉴트리

농림축산식품부

# 제 출 문

농림축산식품부 장관 귀하

이 보고서를 “나노전분캡슐화에 의한 세라마이드의 수용화 및 제품화” 과제의 보고서로 제출합니다.

2013년 07월 31일

주관연구기관명 : (주) 뉴 트 리

주관연구책임자 : 김 도 연

연 구 원 : 정 희 철

연 구 원 : 정 재 윤

연 구 원 : 김 형 민

연 구 원 : 임 지 선

협동연구기관명 : 고 려 대 학 교

협동연구책임자 : 임 승택

협동연구기관명 : 한국산업기술대학교

협동연구책임자 : 임 재 각

# 요 약 문

## I. 제 목

나노 전분 캡슐화에 의한 세라마이드의 수용화 및 제품화

## II. 연구개발의 목적 및 필요성

- 세라마이드는 피부의 각질층에 있는 세포간 지질 성분으로 스펅고신의 아미노기에 지방산이 결합한 것이며 유기용매에만 녹음.
- 현재까지 다양한 연구결과 세라마이드는 미백효과, 보습작용, 피부보호 기능 강화, 아토피성 피부염 증상의 완화 등의 기능이 밝혀졌음. 따라서 세라마이드의 보충은 피부항상성 유지 및 피부병 예방과 치료에 효과적으로 사료됨.
- 이러한 세라마이드의 기능성은 화장품과 같이 피부에 직접 투여하는 것 이외에 경구 섭취 시에도 소화관 흡수를 통해 각질층에 전달되어 피부 능력 개선 효과가 있다는 연구결과가 있음.
- 구강 섭취 시에도 기능이 입증되었기 때문에 향후 기능성 식품 소재로서 세라마이드의 성장 잠재력이 크다고 사료됨.
- 지방족인 세라마이드는 난용성이기 때문에 보통은 유화를 시켜 에멀전 형태로 화장품에 적용하지만 이를 식품에 적용 시 기호성이 떨어지는 문제점이 있음.
- 전분은 아밀로펙틴과 아밀로즈로 구성되어 있으며, 직쇄상 전분사슬 (특히 아밀로즈)은 소수성(hydrophobic) 화합물을 포접하여 일정한 형태를 갖는 복합체를 형성하는 특이성을 나타냄. 이 복합체는 열역학적으로 안정한 형태로 반응이 자발적으로 일어난다.
- 전분 나노 복합체에 포접된 세라마이드는 수용화되며 외부환경에 대한 안정화 효과와 생체이용률 증진을 기대할 수 있음.
- 현재 전분 나노입자의 생성에 관한 기초적 지식이 부족하며, 전분 나노입자의 고부가 산업적 활용 가치를 위해서는 나노입자의 다양한 이화학적 특성을 규명하고, 효율적인 생성공정을 확립하고 제품의 다양화가 가능한 공정 개발이 필요함.

## III. 연구개발 내용 및 범위

- 1) 나노 전분 복합체 제조기술 확립
  - 분자자체조합에 의한 나노입자의 제조
  - 복합체 형성에 의한 결정화
  - Homogenization을 통한 반응 수율 향상 및 입자의 분산안정성 상승효과 분석
  - 다양한 건조방법을 활용한 입자의 영김 방지 효과 분석
  - 나노 분쇄 및 파쇄에 의한 건조 입자의 입도 감소효과 분석
  - 효과적인 건조 및 분쇄 방법을 활용한 제품의 안정성 확보
- 2) 나노 전분 복합체의 이화학적 특성 규명
  - 입도크기 분포 측정
  - 입자 결정구조 분석

- 열전이 특성 연구
- 유변학적 특성 연구
- morphology 연구

- 3) 나노 전분 복합체의 저장안정성, 안전성, 기능성 평가
  - 분말의 나노 전분 복합체의 저장안정성 분석
  - 액상의 나노 전분 복합체의 저장안정성 분석
  - 나노 전분 복합체의 *in vitro* 소화 방출 패턴 분석
  - *in vivo* 경구 투여시 혈액내 세라마이드 흡수율 분석
  - 나노 전분 복합체의 단회투여독성 평가
  - 나노 전분 복합체의 복귀돌연변이 (AMES Test) 평가
- 4) 나노 전분 복합체의 제품 적용
  - 음료 및 화장품의 최적의 배합비 및 기호성 선정
  - 나노 전분 복합체 음료 및 화장품에 대한 저장성 평가
  - 나노 전분 복합체 음료 및 화장품에 대한 안정성 평가
- 5) 대량생산공정 확립
  - 경제적 시스템 개발
  - 기존의 활용되는 복합체와의 효능 및 경제성 비교 분석
  - 시제품 제작
  - Test marketing 실시로 관능평가 실시

#### IV. 연구개발결과

- 1) 나노 전분 복합체 제조기술 확립
  - 나노 전분-세라마이드 복합체의 제조기술을 확립하기 위해 다양한 반응 조건으로 실험을 수행하여 최적 조건을 확립함.
  - 최적 조건 : Batch-system 방식으로 세라마이드를 에탄올 0.5 mL에 분산 시킨 후 50℃에서 1시간 동안 교반하며 액화시킴. 이후 텍스트린 용액에 세라마이드 용액을 부은 후, 50℃에서 550rpm의 속도로 2일 동안 반응 시킨 후 반응물을 25℃에서 하루동안 저장하여 형성된 복합체를 원심분리 과정을 통하여 회수 후 건조하여 최적의 복합체를 제조함.
  - 초음파 분쇄기를 이용해 복합체 안의 일부 마이크로 영역을 나노영역으로 줄일 수 있음.
  - V-amylose의 aggregative한 특성 때문에 건조 방법에 상관없이 엉김 현상이 관찰됨.
- 2) 나노 전분 복합체의 이화학적 특성 규명
  - 제조된 복합체의 평균 입도는 100 nm 이하로 확인함.
  - DSC 측정 결과 105℃ 부근에서 전분-세라마이드 복합체의 융점이 관찰되어 V-amylose를 이루고 있음을 확인함.
  - 제조 조건에 따른 복합체의 morphology를 TEM(동결투과전자현미경)을 통해 입자들의

모양과 크기를 관찰함.

3) 나노 전분 복합체의 저장안정성, 안전성, 기능성 평가

- 액상의 전분-세라마이드 복합체의 경우 3개월 이상의 미생물 안정성 확인함.
- SD Rat에 세라마이드 나노복합체를 단회 경구 투여시 시험물질 투여와 관련된 독성학적 소견이 인정되지 않았으며 치사량치는 2000 mg/kg B.W. 이상임.
- 미생물 복귀돌연변이 유발여부 시험결과, 본 시험 조건하에 사용한 균주들에 대한 복귀돌연변이를 유발하지 않았음(음성).
- 전분-세라마이드 복합체는 소장을 통한 식품의 정상적인 운반시간과 동일한 6시간에 소화 효소에 의해 최대 방출치를 보이는 것을 확인됨.
- SD Rat에 전분-세라마이드 복합체 액상 시료를 경구 투여한 결과, 투여 6시간이후 채혈한 serum그룹에서 물리적 혼합물과의 흡수율 차이가 200%이상 확인됨.

4) 나노 전분 복합체의 제품 적용

- 나노 전분-세라마이드 복합체 음료 3종 제조(바나나맛 PI 3.75/5.0, 사과맛 PI 3.6/5.0, 오미자맛 PI 3.7/5.0).
- 나노 전분-세라마이드 복합체 화장품 3종 제조(수분크림, 아이크림, 안티링클밤).
- 제조된 음료와 화장품의 저장안정성 및 동결용융안정성, 내열성, pH 안정성을 확인함.

5) 대량생산공정 확립

- 산업화를 위해 나노 전분-세라마이드 복합체의 대량생산공정을 확립.
- 음료 시제품을 test-marketing 실시한 결과 총 126명이 참여하였고 PI 5.01/7.0으로 평가되었음.(구체적인 소비자 결과를 반영하고자 7점 척도법 사용)
- 제조된 화장품 시제품을 test-marketing 실시한 결과 총 50명이 참여하였고 PI 5.28/7.0으로 평가되었음.
- 음료와 화장품 시제품을 평가한 결과 두 제품 모두 58% 이상의 재구매의사를 보였음.

# SUMMARY

(영문요약문)

## I. Title

○ Water solubilization and product development of ceramide using nanoencapsulation with starch

## II. Purpose and necessity on development of research

○ Ceramide is an intercellular lipid component in the stratum corneum of the epidermis as well as a fatty acid bound to the amino group of sphingosine. It is soluble only in organic solvent.

○ A diversity of the previous studies revealed ceramide acts as whitening, moisturization, enhancement of skin protection, and mitigation of atopic dermatitis symptoms. Therefore, supplement of ceramide is considered to be effective in maintaining skin homeostasis and preventing and treating dermatosis.

○ There is a study that these ceramide's abilities can improve skin function by oral administration and intake through digestive tracts as well as by direct dermal administration.

○ Its functionality demonstrated by oral administration infers that ceramide has a big market potential as a functional food ingredient

○ Ceramide is usually emulsified and applied in its emulsion form to cosmetics because it's an insoluble aliphatic compound. But, it has a problem that its application to food decreases palatability.

○ Starch consists of amylopectin and amylose. Generally, such linear starch chain (in particular amylose) has specificity that its inclusion of hydrophobic compound makes a constant form of complex. This kind of complex is spontaneously generated by thermodynamically stable reaction.

○ Ceramide included in nanosized starch complex gets soluble and can be expected to have stability against external environment and enhance bioavailability in body.

○ At this moment, we have insufficient basic knowledge on generation of the nanoparticles, and also necessity to identify physiochemical properties of the nano particle, establish its efficient generation process and develop a process enabling product diversification.

## III. Contents and range on development of research

1) Production technic establishment of nanosized starch complex

○ Production of nano particle by molecular self-assembly

○ Crystallization by forming the complex

- Analysis of reaction yield improvement by homogenization and stability-improving effect of particle dispersion
  - Analysis of coagulation preventable effect by a variety of drying method
  - Analysis of particle size shrinkage effect by nanosized pulverization and fragmentation
  - Securement of product stability by efficient drying and pulverizing method
- 2) Identification of physiochemical features of nanosized starch complex
- Measure of particle size distribution
  - Analysis of particle crystal structure
  - Research of heat transfer properties
  - Research of rheological properties
  - Morphological study
- 3) Test of storage stability, safety and functionality of nanosized starch complex
- Storage stability analysis of nanosized starch complex powder
  - Storage stability analysis of nanosized starch complex solution
  - Analysis of *in vitro* digestion and release pattern of nanosized starch complex
  - Analysis of ceramide absorption in blood by *in vivo* oral administration
  - Toxicity evaluation of single-dose nanosized starch complex
  - AMES test of nanosized starch complex
- 4) Application of nanosized starch complex
- Selection of optimal mixing ratio and preference in foods and cosmetics
  - Shelf life test of foods and cosmetics including nanosized starch complex
  - Stability test of foods and cosmetics including nanosized starch complex
- 5) Establishment of mass production process
- Economical system development
  - Economic Comparison of efficacy and economic feasibility with the other established complex.
  - Prototype preparation
  - Sensory test by test marketing execution

#### **IV. Results on development of research**

- 1) Production technic establishment of nanosized starch complex
- Established optimal condition by testing diverse reaction for production technic of nanosized starch-ceramide complex
  - Optimal condition
    - Dispersed ceramide in 0.5 mL ethanol in batch system and then liquefied by

stirring at 50°C for 1 hour

- After poured the ceramide solution into dextrin solution, reacted at 50°C with pace of 550 rpm for 2 days.

- Put the solution at 25°C for a day and centrifuged of the generated complex

- Collected the optimal complex after drying

○ Ultrasonic pulverizer can reduce a part of micro space in the complex into nano space

○ Observed coagulation regardless of drying method due to aggregative property of V-amylose

2) Identification of physiochemical properties of nanosized starch complex.

○ Identified the average size of the generated complex as 100 nm or less.

○ Found with DSC the melting point of the starch-ceramide complex is near 105°C, confirming the formation of V-amylose

○ Observed producing condition-dependent shapes and sizes of the complex using TEM

3) Test of storage stability, safety and functionality of nanosized starch complex

○ Checked Starch-ceramide complex solution has more than 3 month of microbiological stability.

○ Toxicological opinion regarding to dosage of the test material was not acknowledged in single dose oral administration of nanosized ceramide complex to SD rat. Its fatal dose is more than 2000 mg/kg B.W.

○ AMES test of bacteria displayed revertant was not introduced from the bacteria tested under this condition (negative).

○ The largest amount of starch-ceramide complex was released by digestive enzyme for 6 hours, the same time of normal food delivery through small intestine.

○ Oral administration of starch-ceramide complex solution to SD rat revealed the absorption rate difference of physical mixture is more than 200% in the serum group whose blood was gathered 6 hour later than their administration.

4) Application of nanosized starch complex

○ Prepared 3 kinds of beverage including nanosized ceramide complex (banana flavor PI 3.75/5.0, Apple flavor PI 3.6/5.0, Schisandra chinensis fruit flavor PI 3.7/5.0).

○ Prepared 3 kinds of cosmetics including nanosized starch-ceramide complex (lotion, eye cream, anti-wrinke balm) .

○ Ascertained storage stability, freezing/melting stability, heat resistance and pH stability of the prepared beverage and cosmetics.

5) Establishment of mass production process

○ Established mass production process of nanosized starch-ceramide complex for its commercialization.



- 126 participants showed PI 5.01/7.0 in the test-marketing result of the beverage.
- 50 participants showed PI 5.01/7.0 in the test-marketing result of the cosmetic.
- More than 58% presented their repurchase intention in all of both results.

# CONTENTS

SUMMARY .....	2
CONTENTS .....	9
Chapter 1. Outline of Research and Development .....	13
Chapter 2. World-wide trends in related technology .....	16
Section 1. Domestic state .....	16
Section 2. Foreign state .....	19
Chapter 3. Results of Research and Development .....	20
Section 1. Establishment of manufacturing technology ceramide using nanosized starch complex .....	20
1. materials and methods .....	20
2. methods of analysis .....	23
3. results and discussion .....	24
a. Preparation of nanosized ceramide-starch complexes .....	24
b. Check formation or not of nanosized ceramide-starch complexes .....	25
c. Quantitative analysis of nanosized ceramide-starch complexes .....	30
d. Effect in particle size of complexes by ultrasonication .....	30
e. Effect in dispersion stability of various physical treatment .....	31
Section 2. Physicochemical characterization of nanosized starch complexes .....	32
1. materials and methods .....	32
2. methods of analysis .....	36
3. results and discussion .....	38
a. Formation of nanosized ceramide-starch complexes .....	38
b. The crystal structure of nanosized ceramide-starch complexes .....	39
c. Thermal properties of nanosized ceramide-starch complexes .....	41
d. Yield of ceradmie and dextrin .....	43
e. morphology and particle size of nanosized ceramide-starch complexes .....	44
f. Effect in particle size of complexes by pulverization and smash .....	45
g. Aggregation prevention effect of complexes by various drying methods .....	46
Section 3. Standardization of production technology of nanosized starch complexes .....	46
1. Economic improvement of manufacturing process .....	46
2. Establishment of dispersion stability of production .....	56
Section 4. Safety test of nanosized starch complexes .....	60
1. Rat single oral dose toxicity test of nanosized carmide-starch complexes .....	60
2. Bacterial Reverse Mutation (AMES) test of nanosized ceramide-starch complexes .....	68
Section 5. Stability test of nanosized starch complexes .....	76

1. Storage stability test of nanosized ceramide–starch complexes powder .....	76
2. Storage stability test of nanosized ceramide–starch complex solution .....	81
Section 6. Bioavailability of nanosized starch complexes .....	85
1. <i>in vitro</i> test of digestibilities release pattern of nanosized ceramide–starch complexes .....	85
2. body absorption of nanosized ceramide–starch complexes .....	86
Section 7. Development of drink using nanosized ceramide–starch complexes .....	90
1. Optimization of production .....	90
2. Optimization of preference .....	91
Section 8. Development of cosmetics using nanosized ceramide–starch complexes .....	94
1. Optimization of production .....	94
2. Optimization of preference .....	96
Section 9. Storage stability on complete products .....	100
1. Storability test of beverage using nanosized ceramide–starch complexes .....	100
2. Stability test of beverage using nanosized ceramide–starch complexes .....	103
3. Storage stability test of cosmetics using nanosized ceramide–starch complexes .....	108
Section 10. Establishment of the large scale production process .....	114
1. Development of the large scale production process .....	114
2. Development of economical system .....	115
3. Assessment of economic and effect comparison with cyclodextrin complex .....	116
4. Prototype production .....	118
5. Test–marketing .....	121
 Chapter 4. Research Attainments and Contributions to Related Fields ·	132
 Chapter 5. Application Plans for Research Products .....	135
 Chapter 6. Science and Technology Information form Abroad .....	138
 Chapter 7. Reference .....	140

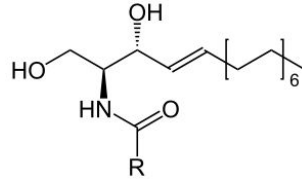
# 목 차

요 약 문 .....	2
목 차 .....	9
제 1 장 연구개발과제의 개요 .....	13
제 2 장 국내외 기술개발 현황 .....	16
제 1 절 국내 기술개발 현황 .....	16
제 2 절 국외 기술개발 현황 .....	19
제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과 .....	20
제 1 절 세라마이드를 이용한 나노전분복합체의 제조기술 확립 .....	20
1. 재료 및 방법 .....	20
2. 분석 방법 .....	23
3. 결과 및 고찰 .....	24
가. 세라마이드 나노전분 복합체 제조 .....	24
나. 세라마이드 나노전분 복합체 형성여부 확인 .....	25
다. 세라마이드 나노전분 복합체 정량분석 .....	30
라. 초음파 분쇄기를 이용한 복합체의 입도감소효과 .....	30
마. 다양한 물리적 처리를 통한 입자의 분산안정성 효과 .....	31
제 2 절 나노전분복합체의 이화학적 특성 규명 .....	32
1. 재료 및 방법 .....	32
2. 분석 방법 .....	36
3. 결과 및 고찰 .....	38
가. 세라마이드 나노전분 복합체 형성 .....	38
나. 세라마이드 나노전분 복합체의 결정구조 .....	39
다. 세라마이드 나노전분 복합체의 열적특성 .....	41
라. 텍스트린과 세라마이드의 수율 .....	43
마. 나노전분복합체의 morphology 및 입도크기 .....	44
바. 나노 분쇄 및 파쇄에 의한 건조입자의 입도 감소 효과 분석 .....	45
사. 다양한 건조방법을 활용한 입자의 영김 방지 효과 분석 .....	46
제 3 절 나노전분복합체 제조기술의 표준화 .....	46
1. 경제성 있는 제조공정 개선 .....	46
2. 제품의 분산안정성 확립 .....	56
제 4 절 나노전분복합체의 안전성 평가 .....	60
1. SD 랫드에 대한 세라마이드 나노전분 복합체의 단회 경구투여 독성시험 .....	60
2. 세라마이드 나노전분 복합체의 미생물복귀돌연변이시험(AMES Test) .....	68
제 5 절 나노전분복합체의 안정성 평가 .....	76
1. 세라마이드 나노전분 복합체 분말의 저장안정성 평가 .....	76
2. 세라마이드 나노전분 복합체 액상의 저장안정성 평가 .....	81

제 6 절	나노전분복합체의 생체이용률 평가 .....	85
1.	세라마이드 나노전분 복합체의 <i>in vitro</i> 소화율 방출 패턴 .....	85
2.	세라마이드 나노전분 복합체의 혈액(Serum)에서의 세라마이드 흡수율 .....	86
제 7 절	나노전분복합체의 소재, 음료개발 .....	90
1.	최적의 배합비 선정 .....	90
2.	최적의 기호성 선정 .....	91
제 8 절	나노전분복합체의 소재, 화장품개발 .....	94
1.	최적의 배합비 선정 .....	94
2.	최적의 기호성 선정 .....	96
제 9 절	완제품에 대한 저장안정성 평가 .....	100
1.	세라마이드 나노전분 복합체 음료의 저장성 평가 .....	100
2.	세라마이드 나노전분 복합체 음료의 안정성 평가 .....	103
3.	세라마이드 나노전분 복합체 화장품의 저장안정성 평가 .....	108
제 10 절	대량생산공정 확립 .....	114
1.	대량생산 공정 확립 .....	114
2.	경제적 시스템 개발 .....	115
3.	Cyclodextrin 복합체와의 효능 및 경제성 비교 분석 .....	116
4.	시제품 제작 .....	118
5.	Test-marketing .....	121
제 4 장	목표달성도 및 관련분야에의 기여도 .....	132
제 5 장	연구개발 성과 및 성과활용 계획 .....	135
제 6 장	연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보 .....	138
제 7 장	참고문헌 .....	140

## 제 1 장 연구개발과제의 개요

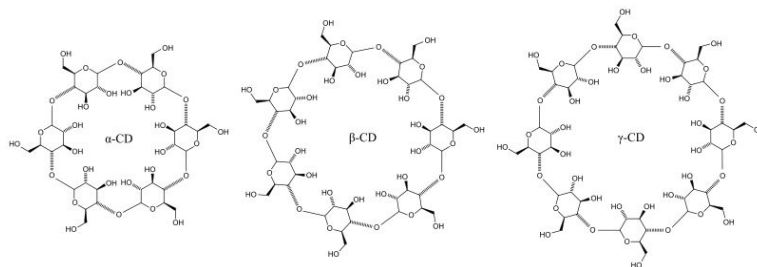
○ 세라마이드는 피부의 각질층에 있는 세포간 지질 성분으로 아래 그림과 같이 스펡고신의 아미노기에 지방산이 결합한 것으로 유기용매에만 녹음.



[그림 1] 세라마이드 구조

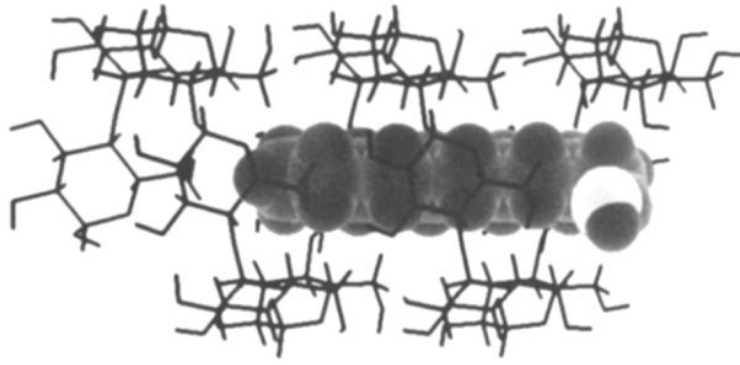
- 글루코세라마이드는 인간 피부의 기저층에서 과립층까지는 증가하고 각질층에서는 거의 소멸함.
- 세라마이드는 글루코세라마이드의 전구체로써 생성되어 각질층에 축적되고 각질세포간 지질의 주성분으로 40~60% 차지함.
- 한편 표피의 세라마이드 함량은 연령에 따라 감소되고, 그에 따라 표피의 보수능력과 보호 기능도 저하되고 주름이 생성되며 피부가 거칠어지게 되고, 또한 아토피성 피부염, 건선의 발증 부위에서 세라마이드 함량의 감소가 관찰되어 있음.
- 지금까지 다양한 연구결과 세라마이드는 미백효과, 보습작용, 피부보호 기능 강화, 아토피성 피부염 증상의 완화 등의 기능성이 밝혀졌음. 따라서 세라마이드의 보충은 피부 항상성 유지 및 피부병 예방 및 치료에 효과적이라고 사료됨.
- 종래 화장품 소재로 합성 세라마이드 또는 우유 유래의 동물성 세라마이드가 이용되었음. 그러나 광우병의 원인인 Prion형의 바이러스에 감염될 가능성이 있기 때문에, 쌀이나 소맥 등 식물 유래의 세라마이드가 주목 받고 이용되고 있음.
- 또한 식물성 세라마이드는 도정 후 버려지는 쌀 미강에서 주로 추출되기 때문에 경제적이며 친환경적인 소재임. 쌀 미강에서 추출한 식물성 스펡고당지질은 동물성 스펡고당지질과 같이 장쇄 염기 스펡고당지질이 산아마이드 결합을 한 소수성 세라마이드가 기본 골격임.
- 쌀 유래 식물성 스펡고지질은 분자 종에 따라 장쇄염기 스펡고신 및 지방산의 탄소수가 다르고 수산기나 이중결합의 유무가 달라 다양성이 있음. 쌀 추출 세라마이드는 합성 및 동물성 세라마이드와 동등한 기능성 (미백효과, 보습작용, 피부보호 기능 강화, 아토피성 피부염 증상완화 등)을 보인다는 연구결과가 있음.
- 이러한 세라마이드의 기능성은 화장품과 같이 피부에 직접 투여하는 것 이외에 경구 섭취 시에도 소화관 흡수를 통해 각질층에 전달되어 피부 능력 개선 효과가 있다는 연구결과가 있음.
- 아직까지 세라마이드는 주로 화장품으로서의 수요가 증가 되지만 구강 섭취 시에도 기능성이 입증되었기 때문에 향후 기능성 식품 소재로서 세라마이드의 성장 잠재력은 크다고 사료됨.
- 현재 미용을 위한 건강 식품 시장은 거의 없는 상태이기 때문에 세라마이드를 효과적으로 식품화 할 경우 뷰티 음료와 같은 새로운 시장 창출이 가능하다고 기대됨.

- 지방족인 세라미드는 난용성이기 때문에 보통 유화시켜 에멀전 형태로 화장품에 적용되고 있음.
- 하지만 에멀전화 할 경우, 많은 양의 유화제를 필요로 하고 이로 인해 타겟 제품 고유의 맛과 향 등에 영향을 주어 식품으로 적용 시 기호성이 떨어지는 문제점이 있음.
- 특히 기능성 소재 및 식품에 대한 소비자 관심이 증가되면서 유화제 같은 화학제품을 식음료나 건강식품에 사용하는 것을 꺼리는 추세임.
- 이러한 문제점 때문에 최근 기능성 식품소재를 사이클로덱스트린(CD)에 포접시켜 수용화 하는 기술이 대두되고 있는 실정임.
- 아래 그림과 같이 CD 분자 내부는 일정한 크기의 빈공간이 있고 외부는 친수성이기 때문에 내부에 소수성 물질을 포접할 수 있으며 친수성인 외부로 인하여 용해도가 증가될 수 있음. 또한 유화제와는 다르게 고유의 맛이 약하기 때문에 식품에 효과적으로 적용할 수 있음.



[그림 2]  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ -Cyclodextrin 구조

- 하지만 CD는 아밀로즈로부터 glucosyltransferase 효소를 이용하여 제조하는 물질이므로 단가가 높은 단점이 있음. 또한 CD분자들은 쉽게 aggregation되는 특성으로 인해 나노수준의 입자생성이 어려워서 고부가 활용에 어려움이 있음.
- 따라서 새로운 방법을 이용한 세라미드의 수용화 기술이 절실히 요구되고 있는 실정임.
- 전분(Starch)은 식물이 광합성에 의해 태양에너지를 축적한 형태로서 형성되는 식품의 주요 탄수화물 고분자로서, 에너지원으로 직접 섭취되거나, 첨가제로서 제지, 의약품, 화장품 등 다양한 산업적 용도로 활용되고 있음.
- 전분은 친환경 생분해성 고분자로서 인체에 안전하며, 태양에너지에 의해 무한정 생성되는 생물자원으로 가격이 저렴하여 산업적 응용 가능성이 높은 소재임.
- 전분은 아밀로펙틴과 아밀로즈로 구성되어 있으며, 아래 그림과 같이 직쇄상 전분사슬(특히 아밀로즈)은 소수성(hydrophobic) 화합물을 포접하여 일정한 형태를 갖는 복합체를 형성하는 특이성을 나타냄. 이 복합체는 열역학적으로 안정한 형태로 반응이 자발적으로 일어남.



[그림 3] Amylose complex with fatty acid (Godet et al., 1993)

- 이러한 복합체 형성 기작은 기존의 CD의 포접형성 기작과 유사하나, 전분 복합체는 X-선 회절상 V-6 형태의 높은 결정성을 가지며 상기 도식화된 single helix 구조를 갖고 있음.
- 또한 CD과는 달리 포접화합물의 특성 및 크기에 따라 복합체의 크기 및 형태가 변화될 수 있어서 다양한 물질의 포접이 가능함.
- 이러한 결정성 복합체의 unit 단위 크기는 1.0 nm 이하로 알려져 있으며, 아직까지 나노수준의 전분 복합체를 회수하는 기술은 보고된 바 없음.
- 따라서 전분 나노 복합체에 포접된 세라미드는 수용화되며 외부환경에 대한 안정화 효과를 기대할 수 있음.
- 전분을 활용하는 장점으로서 체내 소화효소에 의해 전분분자가 분해되므로 controlled release 효과를 나타내어 지속적으로 세라미드가 표피세포에 전달되는 기능이 기대됨.
- 현재 전분 나노입자의 생성에 관한 기초적 지식이 부족하며, 이를 위해서는 나노입자의 생성에 관한 기작, 복합체 형성 및 결정화에 대한 체계적인 연구가 수행되어야 함.
- 또한 전분 나노입자의 고부가 산업적 활용을 위해서는 나노입자의 다양한 이화학적 특성을 규명하고, 효율적인 생성공정을 확립하고 제품의 다양화가 가능한 공정 개발이 필요함.



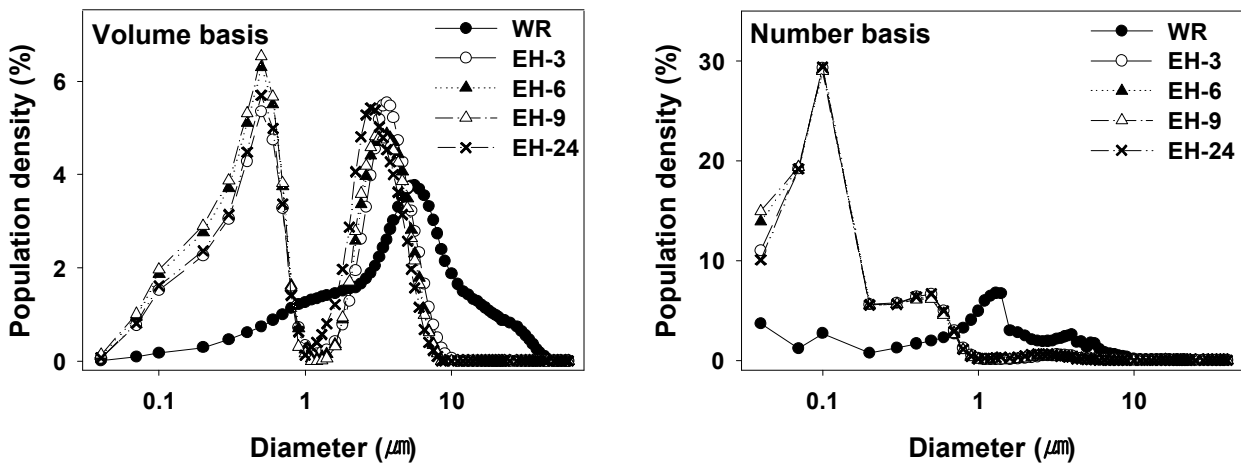
## 제 2 장 국내외 기술개발 현황

### 1절. 국내 기술개발 현황

- 전분을 소재로 하여 나노입자를 제조하는 기술은 아직 체계적으로 확립되어있지 못한 실정임
- 국내 유일하게 본연구진이 수행한 선행연구결과를 바탕으로 체계적인 연구를 수행하고자함

#### 1. 선행연구결과

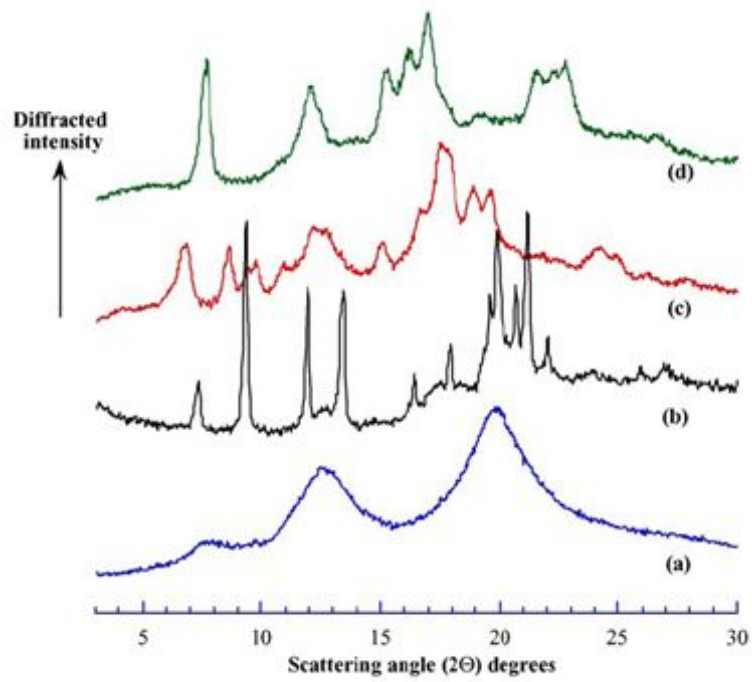
- 전분 fragmentation에 의한 입자크기의 변화
  - 찹쌀 전분(평균 입자크기 5.6  $\mu\text{m}$ )을 알파-아밀라제로 가수분해한 후 초음파 처리 결과 두가지 입자(부피평균 500 nm 와 3.6  $\mu\text{m}$ )를 얻음. 500 nm 입자는 수평균으로 분석한 결과 100 nm 의 입자가 대부분을 차지함을 확인함(그림 1).
  - 이는 결정성 전분 blocklet의 cluster로 간주됨.
  - DSC 및 X-ray분석 결과 가수분해로 결정성의 향상을 가져와, 가수분해가 무정형영역을 선택적으로 제거하는 역할을 하는 것을 확인함(그림 2).
  - 가수분해, 입자의 균질화 및 회수공정을 최적화 시키면 나노입자의 회수가 가능할 것으로 사료됨.



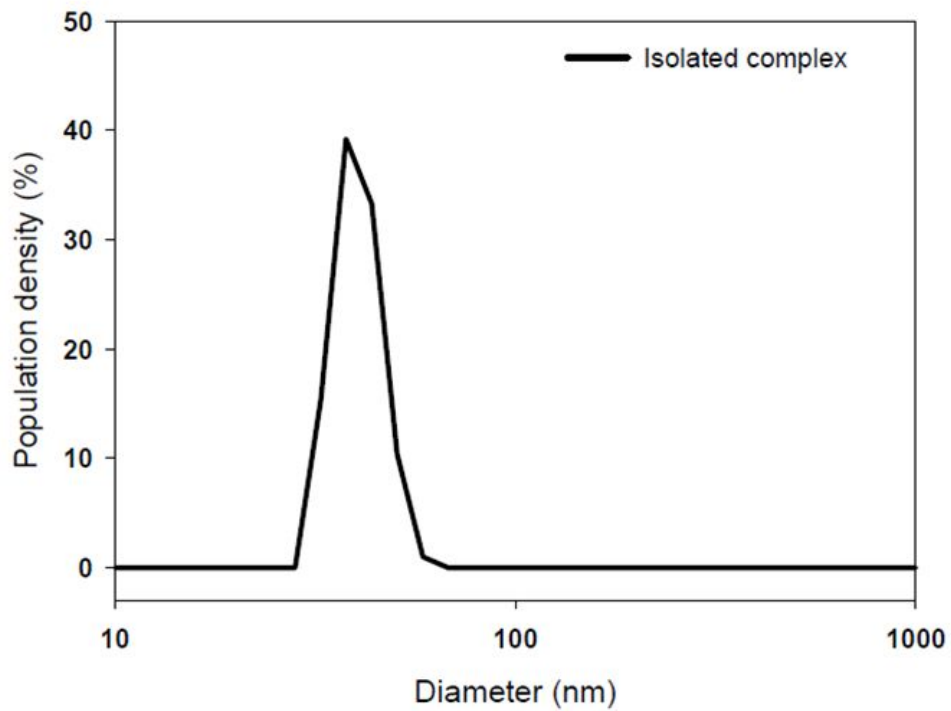
[그림 1] Particle size distribution of hydrolyzed starches

- 막 투과 방법을 활용한 amylose와 n-butanol의 복합체 결정 생성 및 회수
  - 전분 용액과 n-butanol용액이 막을 경계로 분리된 시스템 상에서 전분용액의 전분 분자가 일정한 속도로 막을 통과하여 n-butanol 용액으로 이동하면서 결정입자를 형성하였음(그림 3).
  - Differential scanning calorimetry(DSC) 상에서 입자결정의 용융특성을 분석한 결과 n-butanol 포집 전분 나노결정의 용융개시온도는 70~80 $^{\circ}\text{C}$ , 용융종말온도는 90~100 $^{\circ}\text{C}$ ,

용융엔탈피는 15~18 J/g으로 천연전분에 비해 용융온도 및 엔탈피가 높음을 확인함.

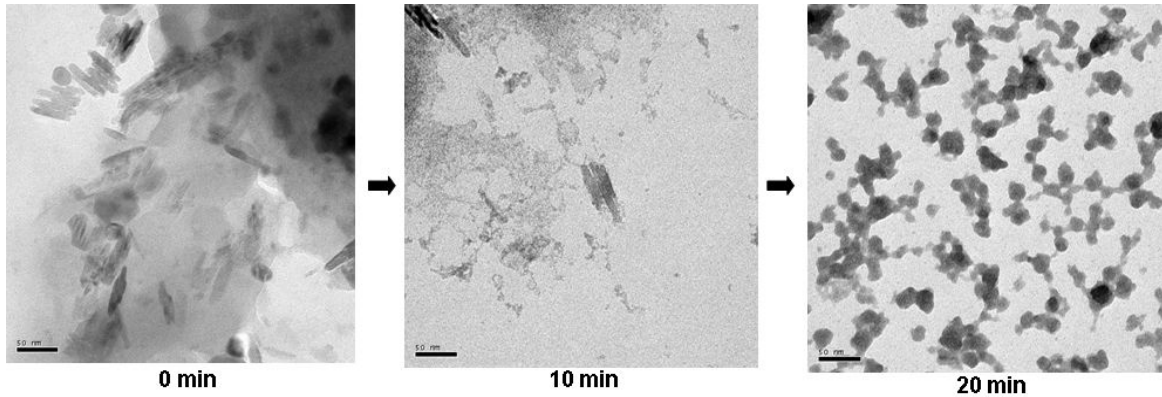


[그림 2] X-ray diffraction diagrams of amylose complexed with (a) decanal, (b) 1-butanol, (c) menthone, and (d) 1-naphtol



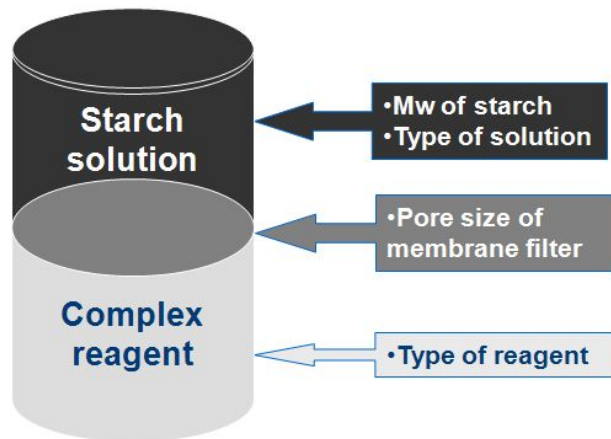
[그림 3] Particle size distribution of the starch-butanol complex

○ 효소를 이용한 amylose-n-butanol 결정의 분리



[그림 4] transmission electron microscopy of the starch-butanol complex

- 위 그림에서 제시하는 바와 같이 transmission electron microscopy 상에서 결정을 관찰한 결과, 가수분해 전의 시료에는 크기 200 nm 이하의 직사각형 형태의 platelet상 결정을 함유함.
- 가수분해를 통하여 무정형 네트워크를 선택적으로 가수 분해하여 나노크기의 결정만이 남아 있음을 확인하였음.
- 아밀로즈와 n-butanol 결정의 무정형 네트워크가 효소가수분해에 의하여 분해되고 상대적으로 결정성이 높은 부분만 남아 나노 결정이 형성되었다고 사료됨.
- 이 연구결과 전분이 n-butanol뿐 아니라 다양한 기능성 물질을 포접할 수 있음을 확인하였으며, 이러한 전분 복합체가 비교적 안정한 결정상의 나노입자로 생성됨을 확인하였음.
- 하지만 복합체의 생성 수율이 매우 낮고(1% 미만), 건조 중 aggregates가 형성되어 분말상 나노입자를 회수할 수 없었음.
- 전분나노복합체 제조(그림 5).



[그림 5] Preparation of starch nanoparticles with kinetic control

## 2절. 국외 기술개발 현황

- 현재까지 전분 나노입자의 제조에 관한 연구는 전세계적으로 단지 4~5편정도 보고되는 실정임
- 보고된 기술은 전분 입자를 물리적으로 파쇄하는 top-down방식이며 체계적 연구가 되어있지 못 하고, 기초적 지식이 미흡함.
- 저분자화된 전분은 지방미셀(micelle)과 유사한 조직감 및 물성을 가지므로 지방대체제로 이용가능하다고 보고됨
- 천연고무를 비롯한 여러 가지 물질의 강도를 높이기 위한 충전제로의 응용이 가능
  - 전분나노입자를 천연고무에 20% 첨가 시 그 탄성과 탄력등의 기능성이 무려 75배나 증가됨
- 기능성 소재 섭취 시 체내에서 desirable bioactive component를 안전하게 delivery 할 수 있는 delivery agents 로 적용가능하다고 보고됨
- 나노전분입자 내부가 비어있는 결정구조를 가져 안정성이 떨어지는 물질을 포집하여 보다 안정적으로 물질을 보관 및 전달할 수 있으므로 식품, 의약품 또는 화장품 산업에 적용 가능할 것으로 전망함

## 제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과

### 1절. 세라마이드를 이용한 나노 전분 복합체의 제조기술 확립

#### 1. 재료 및 방법

##### 가. 실험재료

##### (1) 덱스트린(Dextrin, DP<sub>n</sub> 311)

▪ 70 % 이상의 아밀로즈 함량을 가지고 있는 고아밀로즈 전분 (Hylon VII)을 National Starch & Chemical company (Bridgewater, NJ, USA)로부터 구입하여 실험재료로 사용하였다.

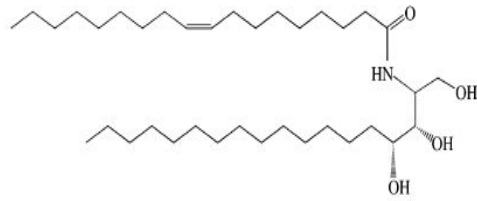
고아밀로즈 전분을 이용한 덱스트린의 제조는 Robyt et al. (1996)의 방법을 따랐다. 고아밀로즈 전분 (25g, dry basis)을 무수알코올 (100 mL)에 분산시킨 후 0.36% (v/v) HCl (약 1mL)을 첨가하여 20℃에서 전분의 가수분해를 시작하였다. 72시간 후 원심분리 (3,500 rpm, 10 min)를 통해 침전물을 회수하였고 70% 에탄올을 이용하여 2회의 세척과정 및 건조과정 (40℃, 24시간)을 통해 DP<sub>n</sub> 311의 덱스트린을 제조하였다.

▪ 덱스트린 내에 존재하는 lipid와 덱스트린간의 복합체 형성을 막기 위한 정제화 과정 (Defatting)은 기존의 잘 알려진 DMSO를 활용한 방법 대신 NaOH를 이용한 공정을 새롭게 개발하여 사용하였다. 이는 추후 덱스트린-세라마이드 복합체를 식품의 소재로 활용할 수 있기 위함이다.

덱스트린 (20g, dry basis)을 NaOH 용액 (1M, 200mL)에 분산 시킨 후 교반과정을 통해 녹인 후 800mL의 물을 넣어 희석시켰다. 그 후 NaOH와 동량의 HCl (1M)을 넣어 덱스트린 용액을 중화시켰다. 완전한 용해를 위해 덱스트린 용액의 Autoclave 처리 (121℃, 20분)를 진행하였으며 95% 에탄올 (3L)을 이용해 덱스트린의 침전을 유도하였다. 원심분리 과정 (3,500 rpm, 10 min)을 통해 침전물의 형태로 회수된 덱스트린은 70% 에탄올을 이용하여 2회에 걸쳐 세척하였으며, 실온의 후드 상에서 건조시켜 분말형태의 덱스트린을 얻었다.

##### (2) 세라마이드(Ceramide)

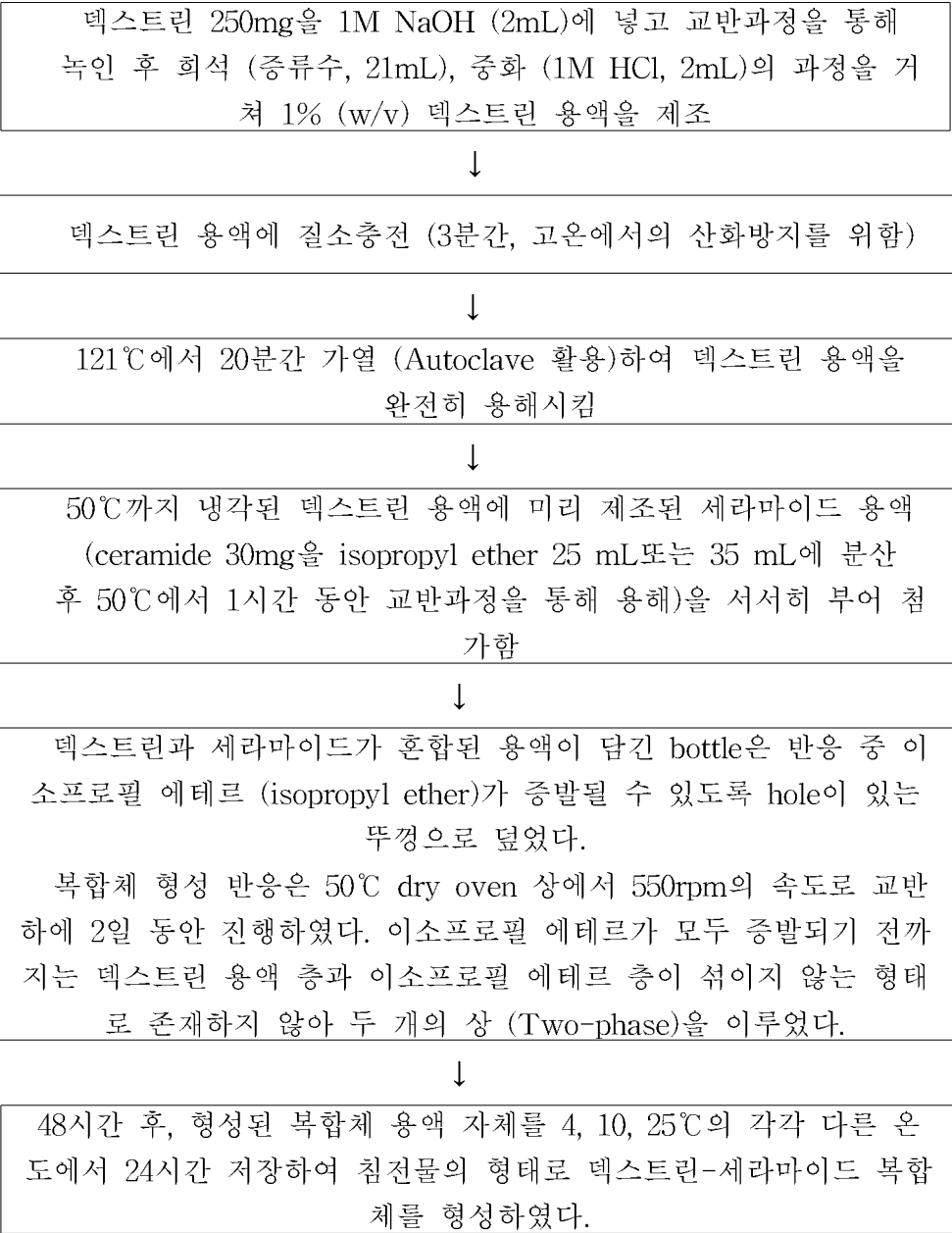
순도 95.0 %의 합성품인 DS-CERAMIDE-Y30를 두산에서 제공받아 실험에 이용하였고, 세라마이드의 화학식은 C<sub>36</sub>H<sub>71</sub>NO<sub>4</sub>로 약 86℃의 높은 융점을 갖고 있다.



[그림 1] 세라마이드 분자 구조

나. 세라마이드 나노전분 복합체 형성 방법

(1) Two-phase system



이는 원심분리 (CR-21G, Hitachi, Japan) 과정을 통하여 회수함  
(5,000 x g, 15분)



회수된 복합체는 24시간 동안 동결건조 (DRC-1000, EYELA,  
Japan) 후 분말시료로 얻어 분석에 활용하였다.

(2) Batch system

덱스트린 250mg을 1M NaOH (2mL)에 넣고 교반과정을 통해  
녹인 후 희석 (증류수, 21mL), 중화 (1M HCl, 2mL)의 과정을 거쳐  
1% (w/v) 덱스트린 용액을 제조



덱스트린 용액에 질소충진 (3분간, 고온에서의 산화방지를 위함)



121°C에서 20분간 가열 (Autoclave 활용)하여 덱스트린 용액을 완  
전히 용해시킴



50°C까지 냉각된 덱스트린 용액에 미리 제조된 세라마이드 용액을  
(ceramide 30mg을 ethyl alcohol 2.0 mL에 분산 후 50°C에서 1시간  
동안 교반을 통해 용해시킴) 서서히 부어 첨가함



Two-phase system과 달리 덱스트린과 세라마이드가 혼합된 용액  
이 담긴 bottle은 open되어 있지 않는 뚜껑으로 덮었다.  
복합체 형성 반응은 90°C water-bath 상에서 550rpm의 속도로 교  
반하에 12시간 동안 진행하였으며 Two-phase system과 달리  
하나의 phase (One-phase)만을 이루었다.



12시간 후, 형성된 복합체 용액 자체를 25°C의 온도에서 24시간 저  
장하여 침전물의 형태로 덱스트린-세라마이드 복합체를 형성하였다.



이는 원심분리 (CR-21G, Hitachi, Japan) 과정을 통하여 회수함  
(5,000 x g, 15분)



회수된 복합체는 24시간 동안 동결건조 (DRC-1000, EYELA,  
Japan) 후 분말시료로 얻어 분석에 활용하였다.

## 2. 분석 방법

### 가. 텍스트린과 세라마이드 함량

#### (1) 텍스트린 함량

텍스트린 분말 시료를 0.1%(w/v) 농도로 물에 분산시킨 후 121℃, 20분간 가열하여 완전히 용해시킨 후 페놀-황산법 (Dubois et al., 1956)에 의해 Spectrophotometer (Ultraspec 2000, Pharmacia Biotech, England)를 이용하여 490nm 에서 정량하였다.

#### (2) 세라마이드 함량

세라마이드 분말 시료를 Isopropyl alcohol/water (7:3,v/v)에 0.1%(w/v) 농도로 분산시킨 후 50℃에서 1시간 동안 세라마이드를 추출한 후 HPLC로 정량해본 결과, 약 7.6 분대에서 세라마이드의 피크가 확인되었다.

#### ▪ HPLC-RI system

컬럼 TSK GEL silica-60 (Tosoh Bioscience, Montgomeryville, PA, USA)

검출기 Refractive index (Shodex RI-71, Tokyo, Japan)

이동상 Isopropyl alcohol/water mixture (7:3, v/v)

유속 0.4 mL/min

### 나. X선 회절 패턴

X-ray diffractometer MO3XHF22 MAC Science Co., Ishikawa, Japan

측정전압 40 kV

측정전류 30 mA

측정범위 4~30° (2θ)

측정속도 1.0°/min



다. 열용량 특성

Differential scanning calorimeter	Seiko DSC 6100, Chiba, Japan
측정시료	샘플:물 = 1:2
측정온도	40~120℃
가열속도	5 °C/min

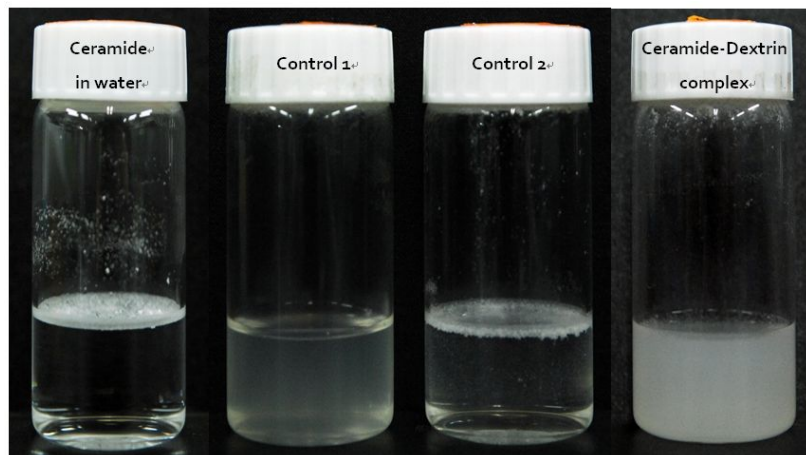
라. 분산안정성 및 입자 분포도 측정 기기

- Zeta-sizer 3000HS Advance (Malvern Instrument GmbH, UK)
- Ultrasonicator (VCX 750, Sonics & materials Inc., Newtown, CT, USA)
- Homogenizer Ultra turrax T25 (IKA WERKE, USA)
- Dynamic light scattering detector (Dynamic Titan, Wyatt Technology, SantaBarbara, CA, USA)

침전물의 형태인 복합체를 원심분리 과정을 통하여 회수함 (5,000 x g, 15분) → 회수된 복합체를 물에 재분산함 (0.1%, w/v) → 호모제나이저를 이용한 균질화 (11,000 rpm, 30 초) 또는 초음파분쇄기 (80% amplitude, 5분간)를 이용하여 마이크로 단위의 복합체를 나노 단위로 사이즈를 줄였으며 이러한 나노 복합체의 Zeta potential (25℃, pH 5.85) 및 입자분포도를 측정하였다.

3. 결과 및 고찰

가. 세라마이드 나노전분 복합체 제조



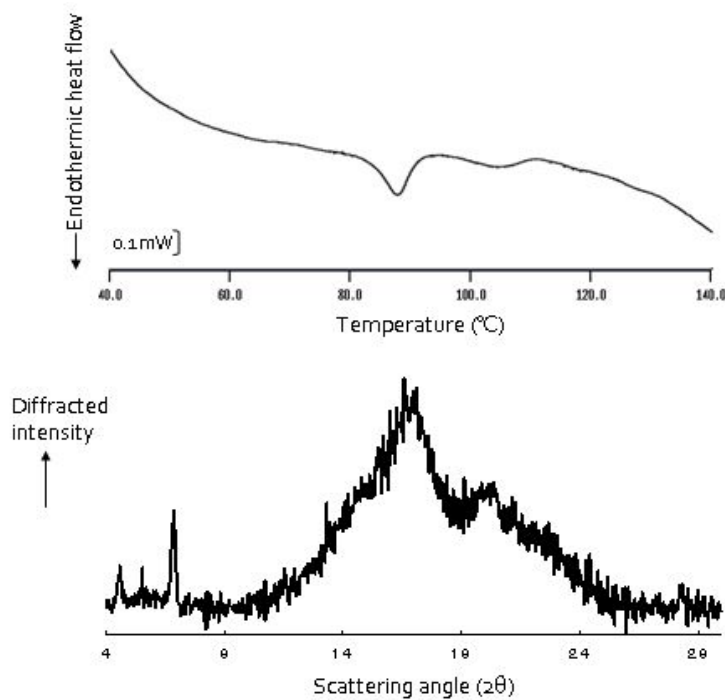
[그림 2] 세라마이드-덱스트린 복합체와 대조군 모습  
(Control 1; ceramide was excluded from the sample.  
In control 2, dextrin was excluded from the sample.)

상기 그림 2는 세라마이드 나노전분 복합체와 대조군의 사진을 나타내고 있다. 세라마이드는 소수성이 높은 물질로 물에 분산시켰을 경우 물 위에 뜨는 성질을 보였다.

복합체 형성과 동일한 조건이지만 텍스트린이 제외된 대조군 2의 경우도 역시 물 위에 세라마이드가 뜨는 양상을 보인다. 하지만, 세라마이드가 텍스트린과 함께 복합체를 형성하였을 경우 균일한 분산액을 얻을 수 있었다. 이는 세라마이드가 텍스트린과 반응함으로써 수용화 될 수 있음을 의미한다.

#### 나. 세라마이드 나노전분 복합체 형성여부 확인

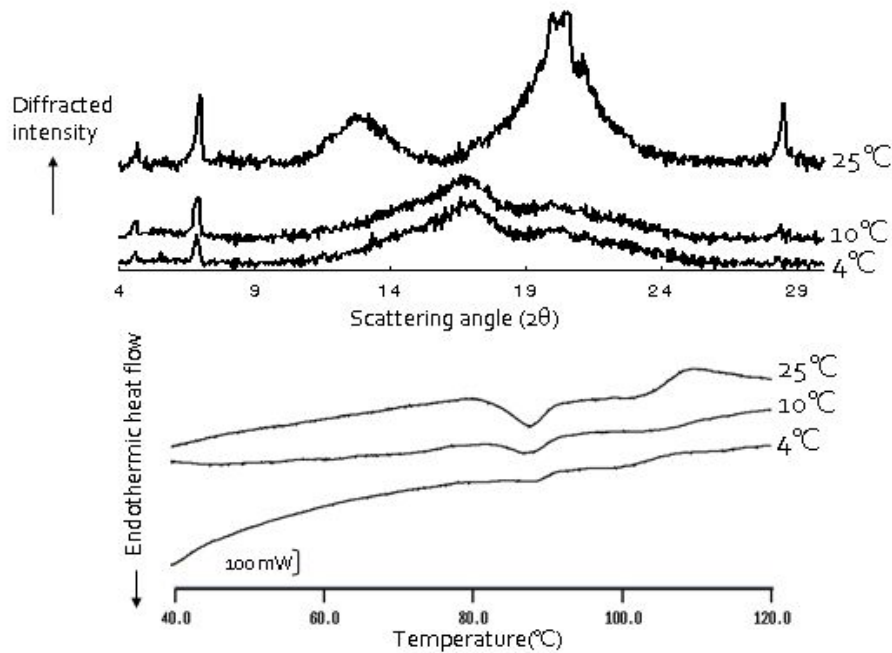
(Differential Scanning Calorimeter(DSC) 와 X-ray Diffractometer(XRD) 이용)



[그림 3] Two-phase 방식 (50°C에서 48시간 반응 후 4°C에서 24시간 저장)을 통해 형성된 복합체의 열전이 특성 및 X선 회절 패턴

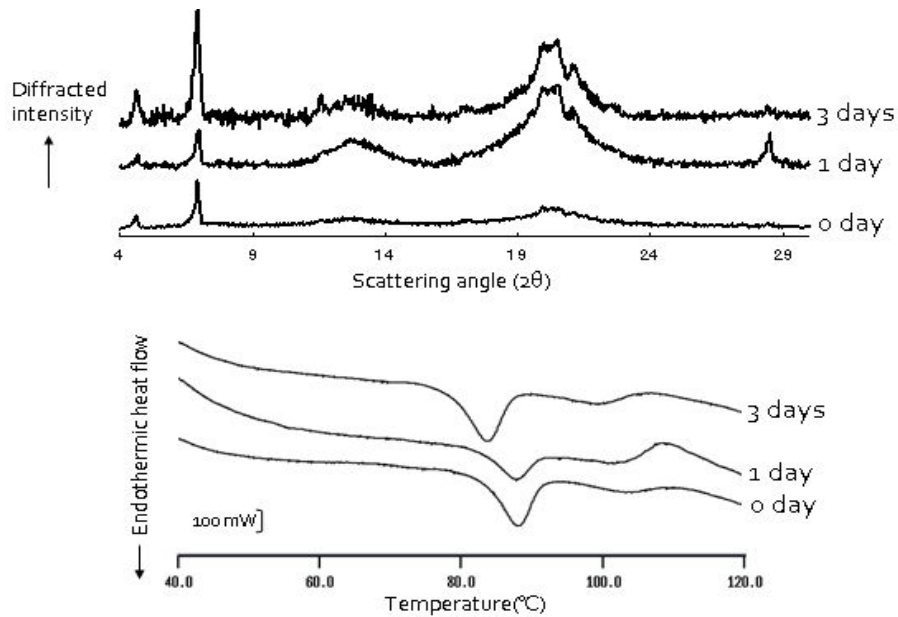
상기 그림 3은 섞이지 않는 두 용매가 표면에서 접촉하는 과정속에서 세라마이드와 텍스트린 분자들간의 복합체 형성을 유도한 two-phase 방식의 DSC와 XRD 결과이다. DSC 측정결과 2개의 피크가 관찰되었는데 약 105°C의 용점을 갖는 피크는 세라마이드 나노전분 복합체의 dissociation 으로 인해 나타났으며, 약 86°C의 용점을 갖는 피크는 복합체 형성에 참여하지 못한 세라마이드의 피크로 추정된다. 긴 직선상의 아밀로즈는 소수성 물질들과 함께 복합체를 형성할 수 있는 능력이 있는데 이러한 복합체를 일반적으로 V-amylose라 명명하며 (Godet et al., 1995) 보통 낮게는 95°C부터 높게는 120°C까지의 용점을 보이는 특성이 있다. 본 실험의 경우 105°C부근에서 용점이 관찰되어 V-amylose를 이루고 있음을 확인할 수 있었다. 그러나, X선 회절을 측정했을 때 17° (2θ) 부근의 강한 피크가 나타났고 이는 복합체 형성 이후 4°C에서 하루 동안 저장하여 텍스트린 분자들간의 강한 결합

이 일어난 결과로 사료된다 (X선 회절에서도 7° (2θ) 부근에서 복합체 형성에 참여하지 못한 세라마이드의 피크가 관찰되었다).



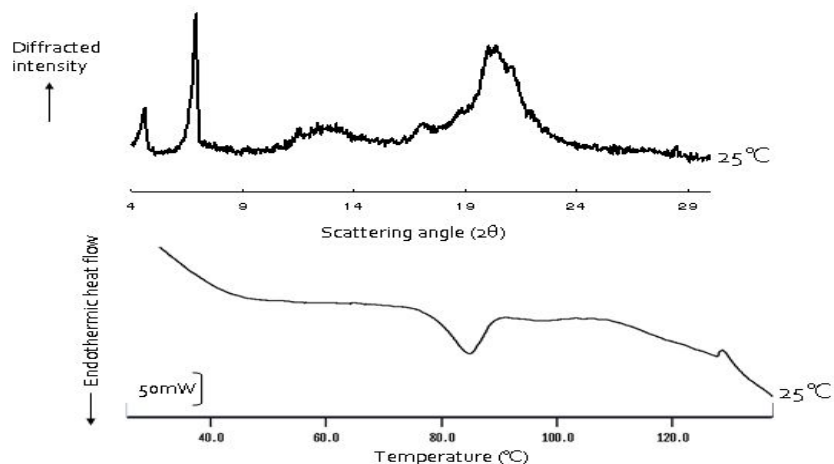
[그림 4] Two-phase 방식 (50°C에서 48시간 동안 이루어짐)을 통해 형성된 복합체를 다양한 온도 (4, 10, 25°C)에서 저장함에 따른 복합체의 X선 회절 패턴 및 열전이 특성

상기 [그림 3]의 결과에 비추어 볼 때 50°C에서 48시간 동안의 복합체 형성과정은 텍스트린과 세라마이드가 복합체를 이루는 데 효과적인 조건이지만 이후 저장온도가 복합체의 결정구조에 영향을 미치는 것으로 판단되어 다양한 온도에서 실험을 진행하였다. XRD 결과에서 볼 수 있듯이 형성된 복합체를 25°C에서 하루 동안 저장했을 때에는 13°와 20° (2θ)에서 강한 피크를 보이는 V6<sub>I</sub> 구조를 보였다. 따라서 세라마이드 분자들은 helix의 cavity 안에만 포접되어 있을 것으로 추정된다 (Rappenecker and Zugenmaier, 1981). 하지만, 낮은 저장온도 (4°C 및 10°C)에서는 텍스트린의 노화로 인한 B-type 크리스탈이 형성되었다. X선 회절 상에서 이들은 25°C와는 다른 결정구조 패턴 (17°와 23° (2θ))을 보이고 있다. 비교적 낮은 온도에 해당하는 4°C 및 10°C에서는 텍스트린과 텍스트린 분자들 사이의 접촉 기회가 많아 상대적으로 텍스트린과 세라마이드 분자들 사이의 상호작용의 기회가 적고 이는 결과적으로 복합체 형성을 제한하였다고 사료된다. DSC 결과도 XRD와 유사한 양상을 보였다. 25°C에서 하루 동안 저장한 복합체 샘플의 경우 105°C 부근에서 복합체 피크가 나타났다. 반면 낮은 온도 (4, 10°C)에서 저장한 샘플의 경우에는 25°C보다는 더 broad 하고 작은 복합체 피크가 형성됨이 관찰되었다.



[그림 5] Two-phase 방식 (50℃에서 48시간 동안 이루어짐)을 통해 형성된 복합체를 다양한 저장시간 (0, 1, 3일) 동안 25℃에서 저장함에 따른 복합체의 X선 회절 패턴 및 열전이 특성

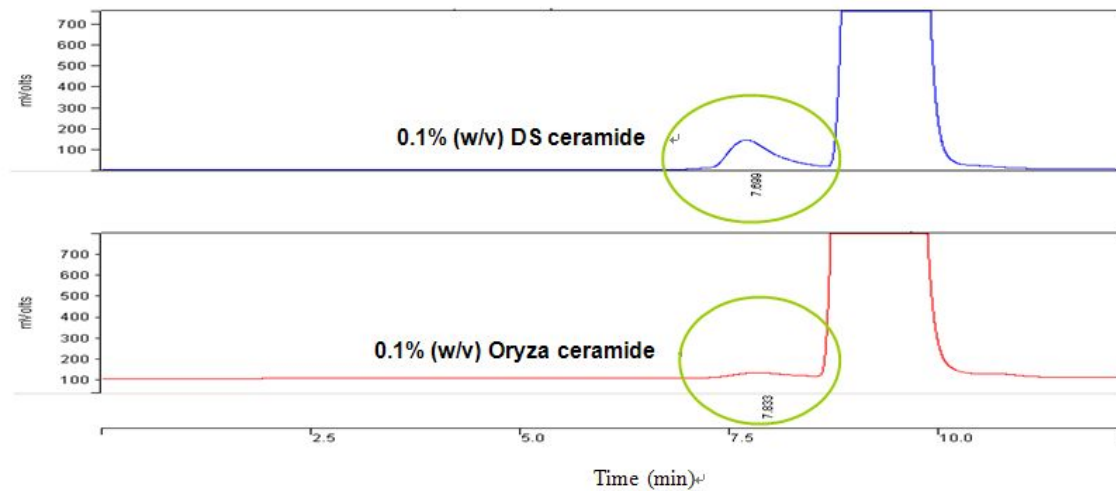
상기 [그림 5]는 25℃에서 복합체의 저장시간을 달리했을 때의 XRD와 DSC 결과이다. 0 day는 2일 동안 복합체 형성 과정 후 저장 시간 없이 바로 isolation을 통해 침전물을 회수한 시료이며 저장 과정 없이도 약하게 V-6 I 타입 형태를 띠고 있음을 알 수 있다. 하지만 하루 동안의 저장 기간을 거친 시료의 경우 더욱 강한 X선 회절 패턴을 나타냈으며 이는 더욱 완전하고 더 많은 결정물이 형성되었음을 의미한다. 저장시간을 3일까지 연장했을 경우에도 이와 비슷한 수준의 결정형태를 유지하였다. 따라서 25℃에서 하루 동안 저장 기간이 최적조건이라 사료된다. DSC 결과에서도 XRD 결과와 유사한 양상을 보였으며 저장 기간이 없는 시료 보다는 1일의 저장 기간을 거친 시료의 경우 더 큰 엔탈피 값을 나타내었다. 3일 동안 저장한 샘플의 경우 특이하게 융점이 105℃에서 100℃로 낮아졌으며 반응에 참여하지 못한 세라미드의 융점도 86℃에서 83℃로 낮아지는 특징을 보였다.



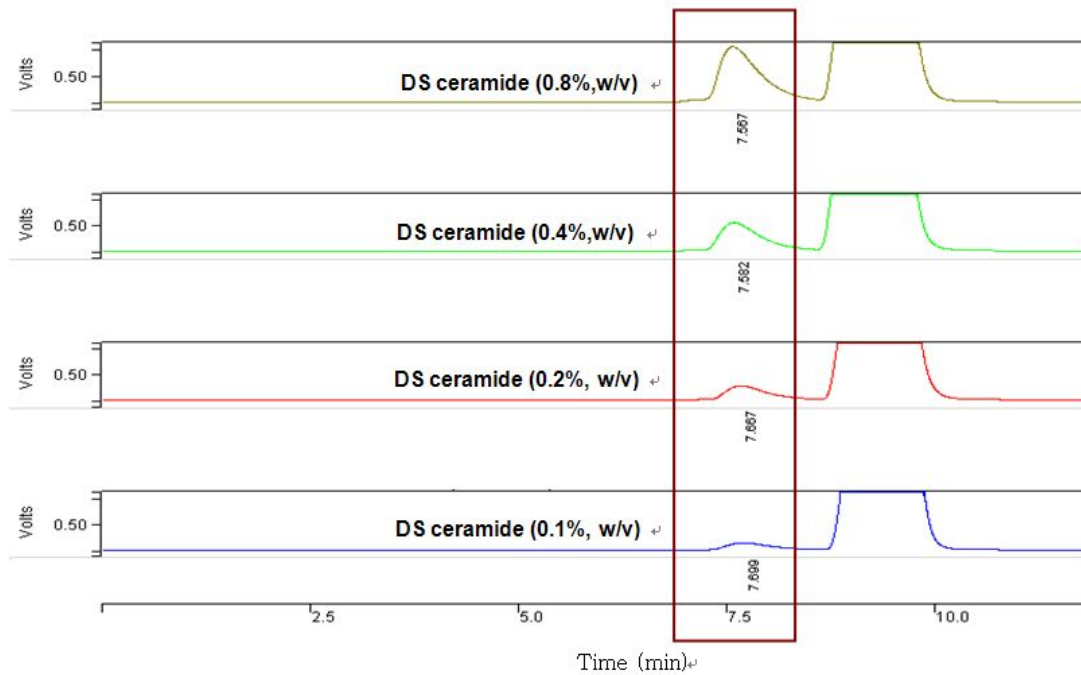
[그림 6] Batch 방식 (90℃에서 12시간 동안 이루어짐)을 통해 형성된 복합체의 X선 회절

패턴 및 열전이 특성 (25℃에서 24시간 동안의 저장기간을 거침)

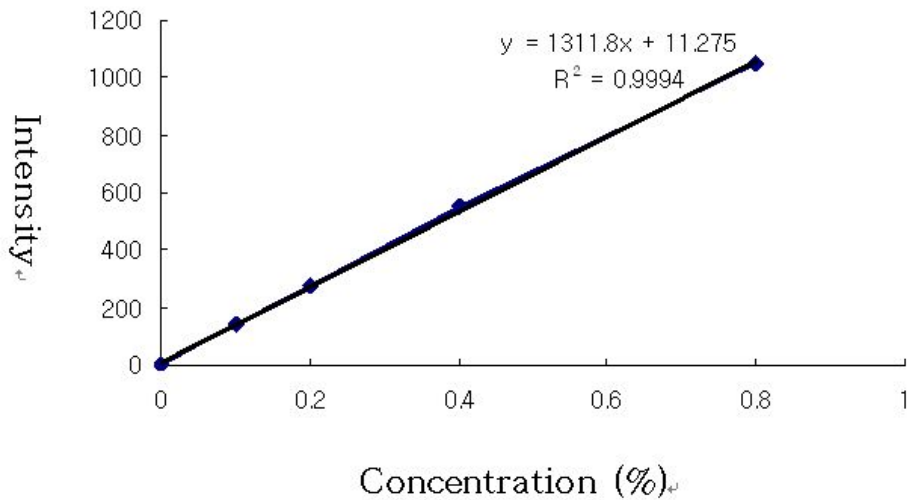
상기 [그림 6]은 텍스트린 용액에 소량의 에탄올 (2.0 mL)을 이용해 세라미이드를 액화시킨 용액을 첨가하여 복합체 형성을 유도한 batch 방식의 XRD와 DSC 결과이다. XRD 결과에서는 전체적으로 V-6<sub>1</sub>타입 (13°, 20° in 2θ)을 보였으며, 17°(2θ)에서 소량의 B-type의 크리스탈이 관찰되었다. DSC 결과에서는 100℃ 부근에서 broad한 피크가 약하게 나타남을 관찰할 수 있었으며 약 130℃에서 exothermic한 피크 또한 관찰되었다. 한편 복합체 형성에 참여하지 못한 세라미이드의 피크 (~86℃)가 상대적으로 크게 나타났다.



[그림 7] 오리자 세라미이드와 두산 세라미이드의 특이성



[그림 8] HPLC-RI 시스템을 이용한 두산 세라미이드의 직선성

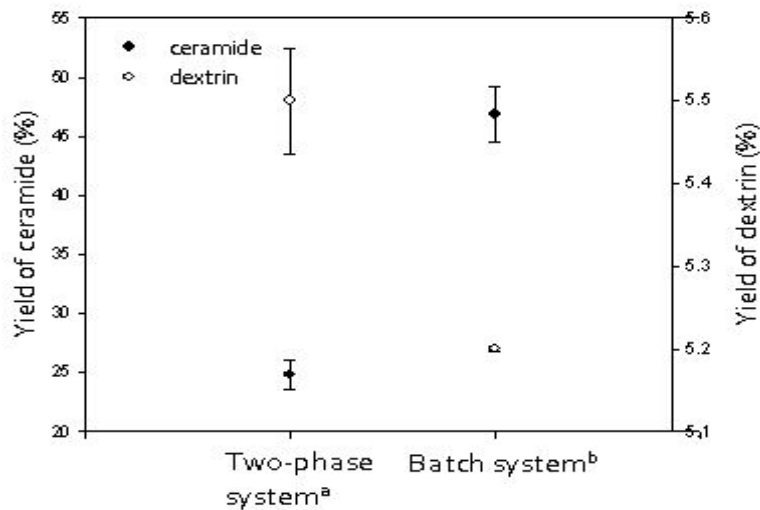


[그림 9] HPLC-RI 시스템을 활용한 세라마이드 검정 곡선

상기 그림 7은 두산에서 제공받은 순도 95%의 합성품인 세라마이드와 쌀겨에서 추출한 순도 3%의 오리자 세라마이드의 정량을 비교한 크로마토그래피이다. 95% 세라마이드는 7.6분대에서 피크가 확인되었고, 3% 세라마이드는 7.8분대에서 피크가 확인되었다. 0.1% (w/v)의 같은 농도로 정량 했음에도 불구하고 3% 세라마이드의 경우 매우 작고 넓은 피크만 관찰되었다. 따라서 본 실험에서는 낮은 순도의 세라마이드를 이용해 복합체를 형성하는 것은 의미가 없다고 판단하였고, 95% 세라마이드를 이용하여 실험에 임하였다. 9분대의 큰 피크는 이소프로필 알코올 피크임을 확인하였다.

그림 9는 95% 세라마이드 16 mg을 이소프로필 알코올 2 mL로 용해(50°C, 1시간)시켜 표준원액으로 정하였다. 표준용액은 표준원액을 이소프로필 알코올로 희석하여 8, 4, 2mg/2mL 농도가 되도록 만든 후 HPLC-RI에 주입하여 얻은 농도별 intensity로 회귀곡선을 작성하여 표준검정곡선을 얻었다. 추후에 세라마이드를 이용한 나노 전분 복합체 제조기술이 확립되면 쌀겨에서 추출된 세라마이드를 정제한 후 복합체 형성을 시도해 볼 계획이다(J.KoreanSoc.Appl.Biol.Chem.50(1),72-76(2007)).

다. 세라마이드 나노전분 복합체 정량분석



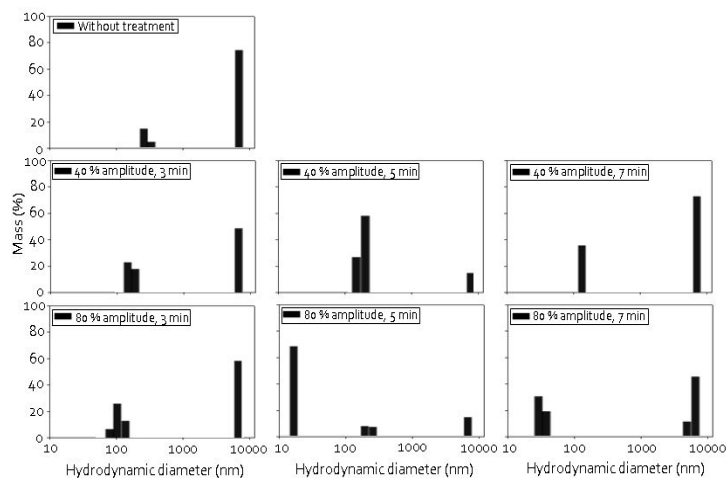
[그림 10] 두가지 다른 방식 (Batch and Two-phase system)을 통해 형성된 텍스트린-세라마이드 복합체내의 텍스트린과 세라마이드 수율

a; Two-phase system was performed at 50°C for 2 days and then stored at 25°C for 1 day.

b; Batch system was performed at 90°C for 12 hr and then stored at 25°C for 1 day.

복합체 안에 존재하는 세라마이드와 텍스트린의 함량 모두 batch 방식이 two-phase 방식보다 높은 것으로 나타났다. 침전물 안에 존재하는 텍스트린의 수율은 5.5% (two-phase 방식), 5.2% (batch 방식)으로 큰 차이가 없었다. 하지만, 세라마이드의 경우 24.8% (two-phase 방식), 46.8% (batch 방식)으로 batch 방식에서 1.89배 더 높게 나타났다. 따라서 텍스트린: 세라마이드의 결합비율은 약 2:1 (two-phase 방식), 약 1:1 (batch 방식)으로 추정된다. 연구개발 내용에 포함되어 있던 homogenization을 통한 반응수율 향상에 대한 실험은 향후 2차년도에 추진할 계획이다.

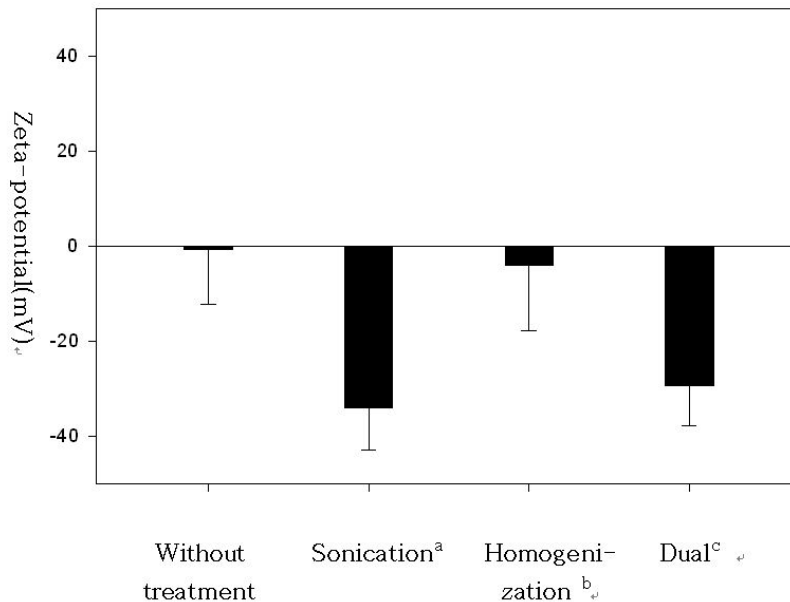
라. 초음파 분쇄기를 이용한 복합체의 입도감소효과 (나노화)



[그림 11] 초음파 분쇄기를 처리한 복합체의 입도 분포 변화

초음파 분쇄기를 이용해 복합체 안의 약 80%에 해당하는 마이크로 영역을 나노영역으로 줄일 수 있었다. 초음파 처리 시간과 진폭을 달리하여 실험을 진행하였고 40% 진폭과 80% 진폭 모두에서 5분 동안의 초음파 처리시간이 마이크로 영역을 감소시키는데 효과적인 것으로 나타났다. 40% 진폭으로 5분간 초음파 처리를 하여 200~300 nm 크기의 복합체를 만들 수 있었으며 80% 진폭에서는 50 nm 이하로까지 사이즈를 줄일 수 있었다. 하지만 초음파 처리 시간을 7분까지 연장하였을 때에는 다시 마이크로 영역이 증가하였고, 이는 장시간의 초음파 처리로 인해 입자들의 응집현상이 일어난 것으로 추정되었다.

마. 다양한 물리적 처리를 통한 입자의 분산안정성 효과 (호모게나이저, 초음파 분쇄기 이용)



[그림 12] 다양한 물리적 처리를 통한 세라마이드 분산액의 표면전하 변화

a Sonication : 80% amplitude, 5 min

b Homogenization : 11,000 rpm, 30 s

c Dual:sonication treatment after homogenization

표면전하는 가까이 있는 입자들 사이의 반발력을 의미하며 이 값은 분산안정성과 관련이 있다. 입자의 크기가 작은 경우 30 mV (음 또는 양의 값) 이상의 표면전하는 분산액의 안정성을 의미하며 응집 (aggregation)에 대한 저항성을 제공한다 (ASTM, 1985). 복합체 용액 자체는  $-0.61 \pm 11.5$  mV의 낮은 분산안정성을 보인다. 하지만 다양한 물리적 처리를 가했을 경우 분산안정성의 상승효과를 관찰할 수 있었다. 호모게나이저를 이용하였을 때 분산안정성의 효과를 기대할 수 있으리라는 연구의도와는 달리 오히려 초음파 분쇄기를 이용했을 때 높은 분산안정성을 관찰할 수 있었다 ( $-34 \pm 8.9$  mV). 호모게나이저와 초음파 분쇄기를 함께 사용했을 경우에도 유사한 수준의 분산안정성이 나타났다 ( $-29.3 \pm 8.5$  mV). 추후 저장시간에 따른 용액의 변화양상을 관찰할 예정이다.



## 2절. 세라마이드 나노 전분복합체의 이화학적 특성 규명

### 1. 재료 및 방법

#### 가. 실험재료

##### (1) 텍스트린(Dextrin, DP<sub>n</sub> 311)

▪ 70 % 이상의 아밀로즈 함량을 가지고 있는 고아밀로즈 전분 (Hylon VII)을 National Starch & Chemical company (Bridgewater, NJ, USA)로부터 구입하여 실험재료로 사용하였다.

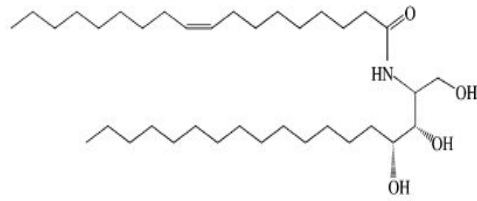
고아밀로즈 전분을 이용한 텍스트린의 제조는 Robyt et al. (1996)의 방법을 따랐다. 고아밀로즈 전분 (25g, dry basis)을 무수알코올 (100 mL)에 분산시킨 후 0.36% (v/v) HCl (약 1mL)을 첨가하여 20°C에서 전분의 가수분해를 시작하였다. 72시간 후 원심분리 (3,500 rpm, 10 min)를 통해 침전물을 회수하였고 70% 에탄올을 이용하여 2회의 세척과정 및 건조과정 (40°C, 24시간)을 통해 DP<sub>n</sub> 311의 텍스트린을 제조하였다.

▪ 텍스트린 내에 존재하는 lipid와 텍스트린간의 복합체 형성을 막기 위한 정제화 과정 (Defatting)은 기존의 잘 알려진 DMSO를 활용한 방법 대신 NaOH를 이용한 공정을 새롭게 개발하여 사용하였다. 이는 추후 텍스트린-세라마이드 복합체를 식품의 소재로 활용할 수 있기 위함이다.

텍스트린 (20g, dry basis)을 NaOH 용액 (1M, 200mL)에 분산 시킨 후 교반과정을 통해 녹인 후 800mL의 물을 넣어 희석시켰다. 그 후 NaOH와 동량의 HCl (1M)을 넣어 텍스트린 용액을 중화시켰다. 완전한 용해를 위해 텍스트린 용액의 Autoclave 처리 (121°C, 20분)를 진행하였으며 95% 에탄올 (3L)을 이용해 텍스트린의 침전을 유도하였다. 원심분리 과정 (3,500 rpm, 10 min)을 통해 침전물의 형태로 회수된 텍스트린은 70% 에탄올을 이용하여 2회에 걸쳐 세척하였으며, 실온의 후드 상에서 건조시켜 분말형태의 텍스트린을 얻었다.

##### (2) 세라마이드 (Ceramide)

- 명칭: DS-CERAMIDE-Y30 (N-Oleoylphytosphingosine)
- 순도: 95.0%
- 형태: 분말
- 화학식: C<sub>36</sub>H<sub>71</sub>NO<sub>4</sub>
- 구조: 스펅고신에 지방산이 연결되어 있는 구조를 가지고 있는 스펅고지질의 일종 (하단의 그림 1 참고)



[그림 1] 세라마이드의 분자구조

- 융점: 약 84℃
- 분자량: 582
- 물에 대한 용해도: 불용성



[그림 2] 물에 분산된 세라마이드 모습

- 기능: 피부 각질층을 구성하는 각질 세포간 지질 중 40~60%를 차지하며, 수분 증발을 억제하는 지질 방어벽 역할과 각질층의 정연한 구조를 유지하게 하는 기능을 가지고 있다.

#### 나. 세라마이드 나노 전분복합체 형성 방법

##### (1) Two-phase system

텍스트린 250mg을 1M NaOH (2 mL)에 넣고 교반과정을 통해 녹인 후 물로 희석 (21 mL), 1 M HCl (2 mL)로 중화한 후 1% (w/v) 텍스트린 용액을 제조



텍스트린 용액에 질소충진 (3분, 고온에서의 산화방지를 위함)



121℃의 고온고압 하에서 (Autoclave 이용) 텍스트린을 완전히 녹여줌 (20분간)



세라마이드 (30 mg, dry basis)를 이소프로필 에테르 (25~35 mL)에 분산 후 50℃에서 1시간 동안 교반을 통해 세라마이드를 액화시킴



50℃까지 냉각된 덱스트린 용액에 미리 제조된 세라마이드 용액을  
천천히 부어준 후 hole이 있는 뚜껑으로 덮어  
50℃에서 550rpm으로 2일 동안 교반시킴 (이소프로필 에테르가  
증발되면서 세라마이드가 덱스트린 용액 안으로 들어가 복합체를 형성  
하도록 유도함)



24시간 후 형성된 복합체 용액 자체를 하루동안 25℃에서 저장하여  
침전물의 형태로 덱스트린-세라마이드 복합체를 형성하였다.

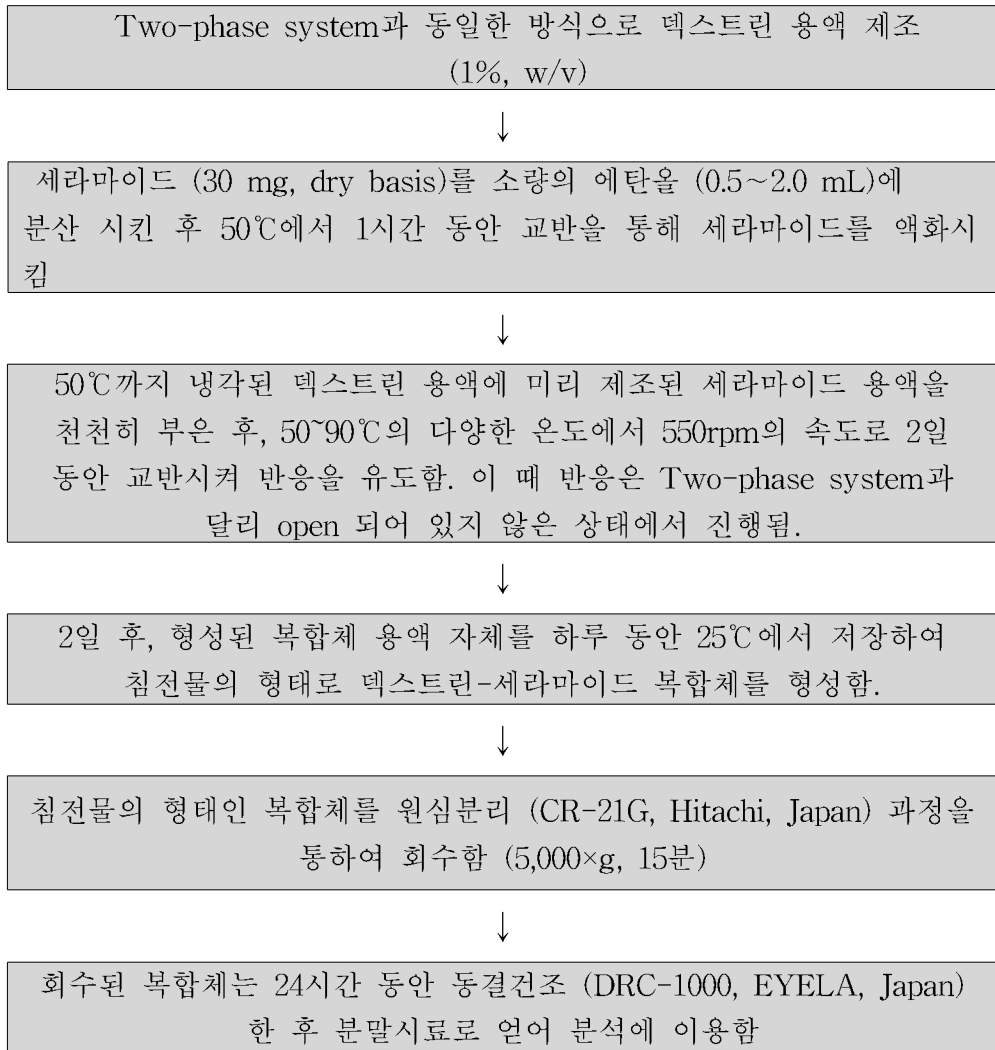


침전물의 형태인 복합체를 원심분리 (CR-21G, Hitachi, Japan) 과정을  
통하여 회수함 (5,000×g, 15분)

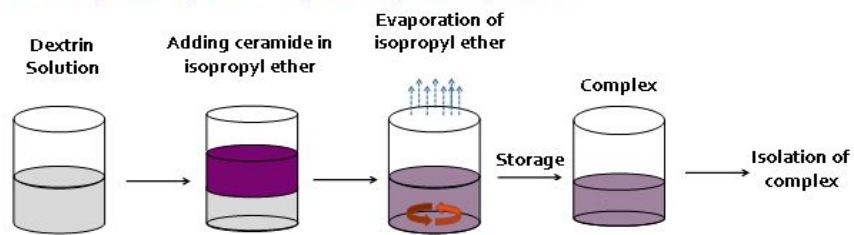


회수된 복합체는 24시간 동안 동결건조 (DRC-1000, EYELA,  
Japan) 후 분말시료로 얻어 분석에 이용함

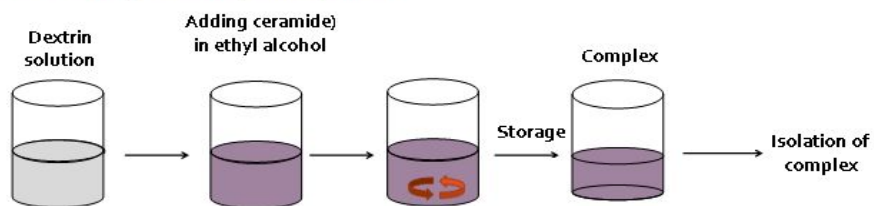
(2) Batch system



1. Two-phase system (organic/aqueous phase)



2. Batch system (aqueous phase)



[그림 3] 세라마이드-덱스트린 복합체 형성 유도 과정 모식도

## 2. 이화학적 특성 규명 방법

### 가. 나노 전분복합체의 결정구조

- 측정기기: X-ray diffractometer (MO3XHF22 MAC Science Co., Ishikawa, Japan)
- 측정범위:  $5 \sim 30^\circ$  ( $2\theta$ )
- 측정전압: 40 kV, 측정전류: 30 mA
- 측정속도:  $1.0^\circ/\text{min}$

### 나. 나노 전분복합체의 열적 특성

- 측정기기: Differential scanning calorimeter (DSC, Seiko DSC 6100, Chiba, Japan)
- 수분함량: 70% (샘플:물=1:2)
- 측정온도:  $40 \sim 120^\circ\text{C}$
- 가열속도:  $5^\circ\text{C}/\text{min}$

### 다. 텍스트린과 세라마이드의 수율

#### (1) 텍스트린 함량

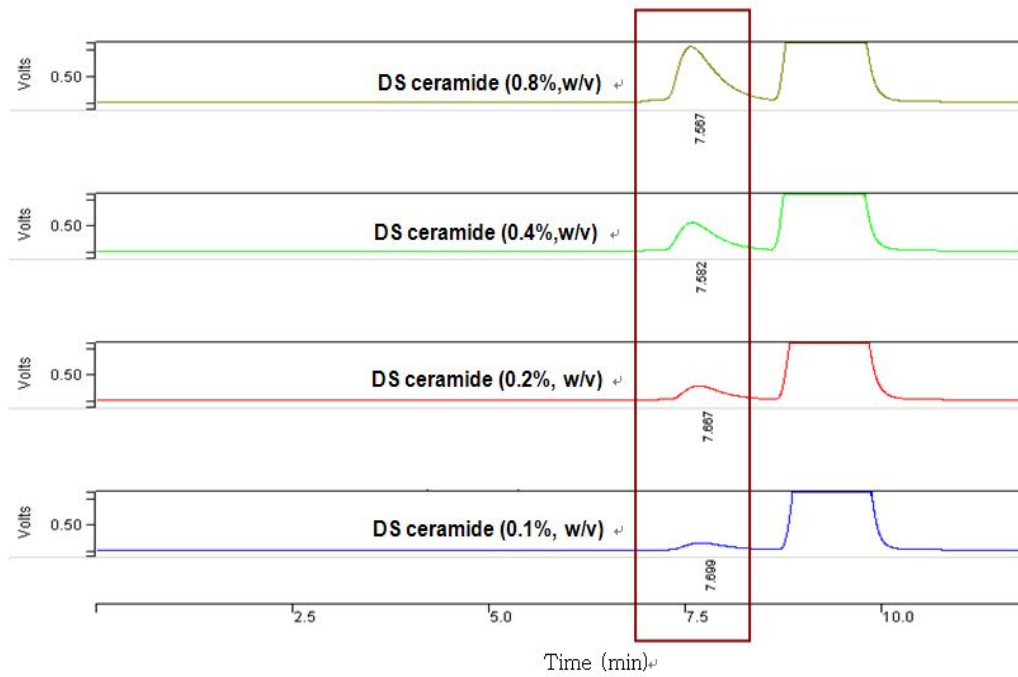
- 분말 시료 형태로 얻어진 복합체를 물에 재분산 (0.1%, w/v) 시킨 다음  $121^\circ\text{C}$ 에서 복합체 안에 존재하는 텍스트린의 추출을 유도하였다.
- 추출된 텍스트린은 페놀-황산법 (Dubois et al., 1956)을 이용하여 분광광도계 (Ultraspec 2000, Pharmacia Biotech, England)를 이용하여 정량하였다.

#### (2) 세라마이드 함량

- 분말 시료 형태로 얻어진 복합체를 isopropyl alcohol에 재분산 시킨 다음  $50^\circ\text{C}$ 에서 1 시간 동안 교반과정을 통해 복합체 안에 존재하는 세라마이드를 추출한 후 HPLC를 이용해 정량하였다.

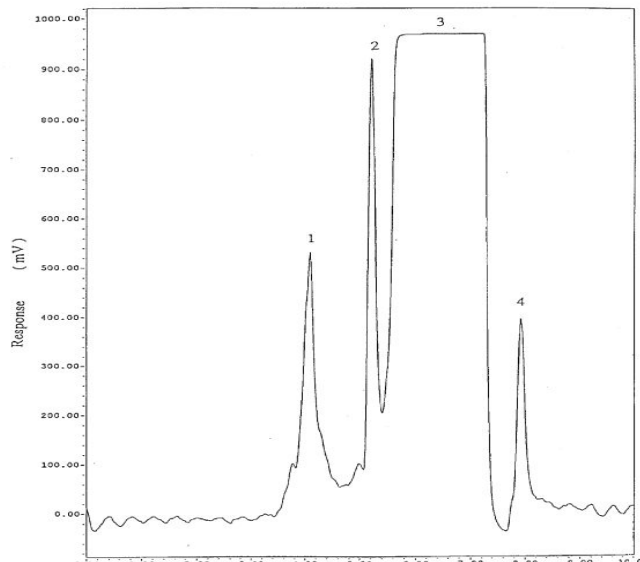
#### (가) HPLC-RI 조건

- 검출기: Refractive Index (Shodex RI-71, Tokyo, Japan)
- 이동상: Isopropyl alcohol/water mixture (7:3, v/v)
- 유속: 0.4 mL/min
- 컬럼: TSK Gel silica-60 (Tosoh Bioscience, Montgomeryville, PA, USA)



[그림 4] HPLC-RI 시스템을 활용한 세라마이드의 직선성

· 농도가 증가함에 따라 7.6 분대의 피크가 증가하는 것을 확인할 수 있었고, 이는 세라마이드 피크임을 알 수 있었다. 한편 9분대에 나타나는 큰 피크는 세라마이드 제품안에 존재하는 스펡고 리피드로 추정되며, 이는 아래 문헌상에서 확인한 바와 일치한다 (McNabb et al., 1999).



[그림 5] Chromatograms of lipid extracts from yeast obtained by MaNabb et al. (27).

Lipids were separated on a silica gel column and a mobile phase of chloroform/ethanol/triethylamine/formic acid and detected using an ELSD detector.

Peaks: 1, hydroxy fatty acids ceramide; 2, C-2 ceramide; 3, sphingolipid; 4,

phytosphingosine. Peaks were identified by comparison of retention times to those of pure authentic standards.

라. 나노 전분복합체의 morphology 및 입도크기

- 측정기기: TEM (FEI Tecnai G2 F30, Eindhoven, Netherlands)
- 측정시료: 원심분리 후 얻어진 침전물 (0.3 mg, wet basis)을 물에 재분산시켰고, 이 분산액을 2% (w/v) uranyl acetate를 이용해 음성염색, 건조 후 관찰하였다.
- 측정전압: 200 kV

마. 나노 분쇄 및 파쇄에 의한 건조입자의 입도 감소 효과 분석

- 측정기기: Ultrasonicator (Sonics & materials, 550W/cm<sup>2</sup>, VCX 550, USA) 및 DLS (Dynamic Titan, Wyatt Technology, SantaBarbara, CA, USA)
- 측정시료: 침전물의 형태로 회수된 복합체를 물에 재분산한 후 (0.1%, w/v) → 40, 80%의 amplitude에서 5분간 ultrasonication 후 사이즈 분포도를 측정하였다.

바. 다양한 건조방법을 활용한 입자의 응집 방지 효과 분석

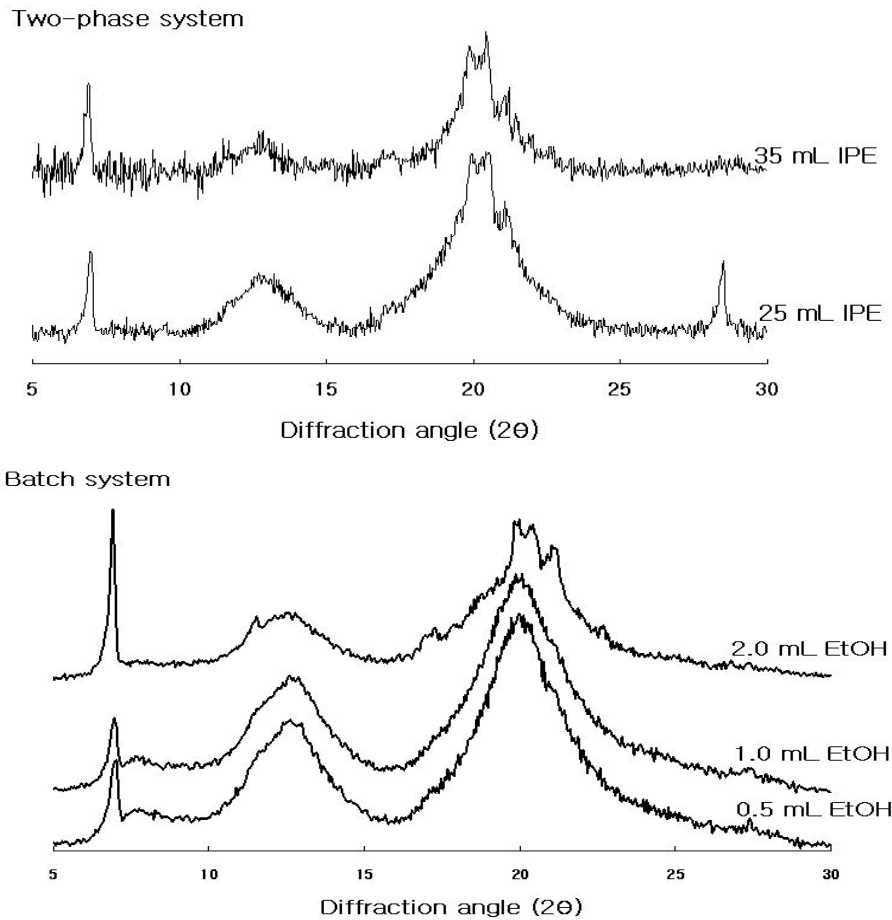
- 원심분리 후 회수된 복합체를 24시간 동안 freeze-drying, vacuum drying, air drying 등의 방법을 이용해 건조시켰다.
- 건조된 입자의 응집 정도는 금속코팅 후 10 kV의 가속전압 하에서 SEM (Scanning Electron Microscopy, JSEM 5410 LV System, Tokyo, Japan)을 통해 관찰하였다.

### 3. 결과 및 고찰

가. 세라마이드 나노전분복합체 형성

- 1차년에 수행한 결과들을 바탕으로 좀 더 구체적으로 실험에 접근하여 세라마이드 나노전분복합체 형성의 최적 조건을 찾고 생성기작을 연구하고자 하였다.
- 본 실험에서도 1차년과 동일하게 2가지 방식 (Batch system과 Two-phase system)으로 복합체 형성을 유도하였다. 에탄올·이소프로필 에테르와 같은 유기용매가 세라마이드를 녹이고 텍스트린과의 상호작용을 일으킨다는 내용의 이전 결과들을 바탕으로 용매의 양과 복합체 형성시의 반응온도 등의 변수를 두어 구체적으로 실험에 접근하였다.

나. 세라마이드 나노전분복합체의 결정구조



[그림 6] 두가지 다른 방식 (Batch and Two-phase system)에서 형성된 복합체의 X선 회절 패턴에 대한 용매의 효과

(Ceramide (30 mg) was dissolved in different amounts of ethanol (0.5-2.0 mL) for the batch system or isopropyl ether (25-35 mL) for the two-phase system.)

- 상기 [그림 6]은 2가지 서로 다른 방식을 통해 세라마이드와 텍스트린 분자들간의 상호작용을 통한 복합체 형성을 유도하였을 때의 XRD 결과이다.
- 복합체 형성 방식 즉 Two-phase system 혹은 Batch system에 상관 없이 모든 복합체는 7.0, 13.03, 20.35° ( $2\theta$ ) 부근에서 피크를 보이는 전형적인 V6<sub>I</sub>-type의 패턴을 보였다. 7.0° ( $2\theta$ )의 피크는 복합체 형성에 참여하지 못한 재결정화된 세라마이드 피크와 중첩된다.
- 일반적으로 V6<sub>I</sub>-type의 구조는 직쇄상의 guest compound, 예를 들면, fatty acids, emulsifier, alcohol 등이 전분 혹은 아밀로즈와 함께 형성할 수 있다고 보고되고 있다 (Buléon et al., 1984; Brisson, Chanzy, & Winter, 1991; Whittam et al., 1989). 세라마이드 역시 직쇄상의 아미노 알코올 구조를 보이므로 본 실험에서 V6<sub>I</sub>-type의 구조를



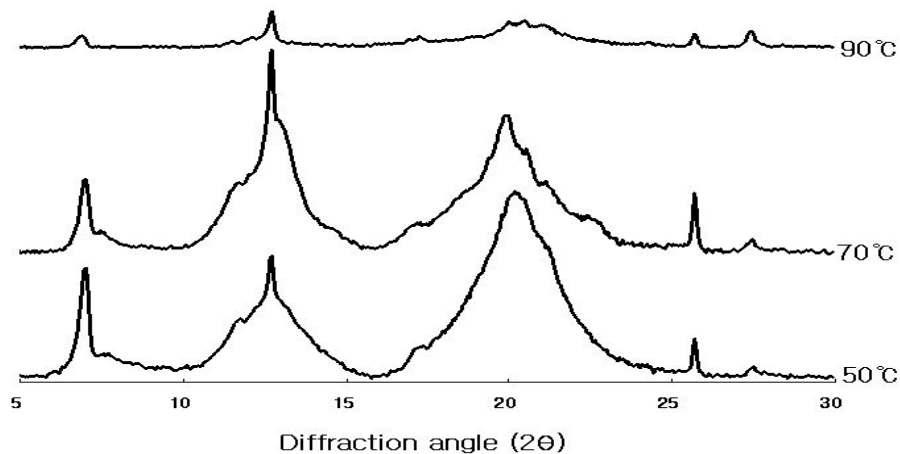
형성할 수 있을 것으로 사료된다.

- 한편, 세라미드를 액화시키는데 사용된 유기용매 (에탄올, 이소프로필 에테르) 역시 텍스트린과 부분적으로 복합체를 형성하는 것으로 XRD 결과상 관찰되었다 (결과 미제시). 이는 유기용매 없이 분말형태의 세라미드와 텍스트린 간에는 어떤 결정성의 XRD 패턴을 보이지 않은 결과를 통해 확인되었다.

- 결정성의 정도는 세라미드가 존재할 때 더욱 증가함을 관찰할 수 있었다 (batch system과 two-phase system 모두에서). 따라서 세라미드가 텍스트린의 구조적 변화 (V-amylose)를 유도하는데 있어서 중요한 역할을 하는 것으로 판단된다.

- 복합체 형성 정도는 사용한 유기용매의 종류와 양에 따라 다른 양상을 보인다. 앞서 언급했듯이 세라미드를 녹이는데 사용된 유기용매는 V6<sub>I</sub>-type 구조 형성을 유도했지만 첨가한 양과 결정성 간에는 양의 관계를 보이지 않았다. 상대적으로 적은 양의 유기용매를 이용한 경우 더 결정성이 높은 구조를 보였다. 이는 더 큰 양의 유기용매의 경우 텍스트린의 amorphous aggregates 형성을 야기하였기 때문으로 간주된다. 이러한 가설은  $2\theta = 7.0^\circ$  피크 즉, 복합체 형성에 참여하지 못한 재결정화된 세라미드 피크 크기가 사용된 용매의 양이 증가할수록 커짐을 통해서도 입증된다.

- 한편 더욱 견고하고 완전한 복합체를 형성하는데 있어서는 batch system이 two-phase system 보다 더 효과적임을 XRD의 결정성 정도를 통해 확인되었다.

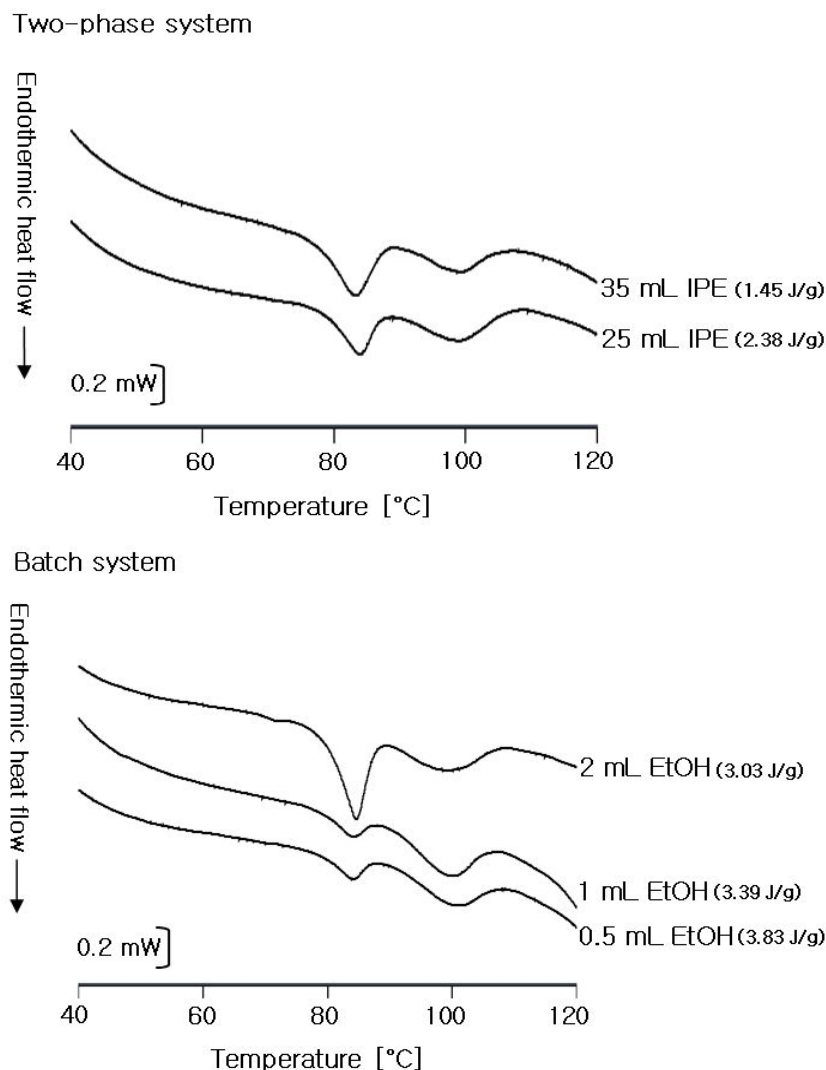


[그림 7] Batch system 상에서 복합체를 형성할 때 반응 온도에 따른 X선 회절 패턴의 변화(The complex formation was performed at 50, 70 or 90°C for 2 days followed by a storage at 25°C for 1day. Ceramide (30mg) was dissolved in 0.5 mL of ethanol to be used in the complex formation.)

- Batch system에서의 복합체 형성은 반응 온도를 달리하여 더욱 연구되었다. 상기 [그림 6]에서의 최적조건에 해당하는 에탄올 0.5 mL을 이용해 세라미드를 용해시킨 후 사용하였다.

-  $2\theta = 7.0^\circ$  피크의 크기 정도는  $90^\circ\text{C} < 70^\circ\text{C} < 50^\circ\text{C}$  순이었다. 특히  $90^\circ\text{C}$ 에서의 XRD 패턴은 다른 온도에 비해 훨씬 덜 뚜렷하였다. 텍스트린 사슬들이 guest compound와 상호작용하기 위해서는 충분한 운동성이 요구되며 이는 온도가 증가함에 따라 증가된다. 따라서 높은 온도는 텍스트린과 세라마이드 사이의 복합체 형성을 유도하기 위해 우선시 되는 것으로 간주된다. 하지만, 본 실험에서의 결과는 기존의 보고와는 다른 양상을 보였다. 상대적으로 높은 온도에 해당하는  $90^\circ\text{C}$ 가 오히려 복합체 형성을 방해하는 것으로 나타났다. 이는 7.0, 13.03,  $20.35^\circ$  ( $2\theta$ )의 피크 크기를 통해 확인되었다. 이러한 결과는 고온에서 에탄올의 빠른 증발로 인한 세라마이드 분자들 사이의 재결정화가 더욱 촉진되었기 때문에 나타난 것으로 사료된다.

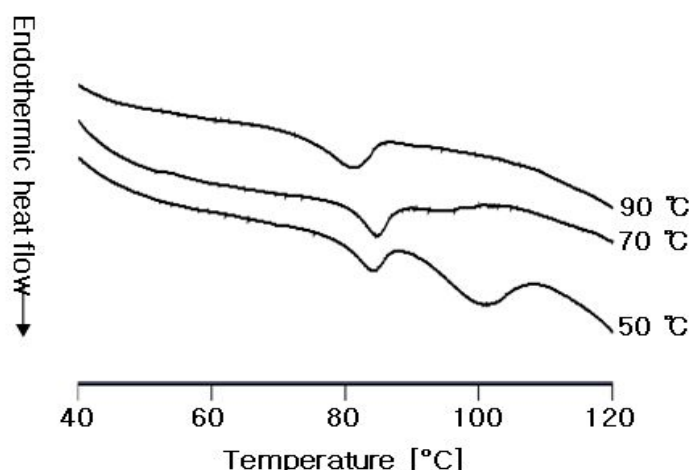
#### 다. 세라마이드 나노전분 복합체 열적특성



[그림 8] 두가지 다른 방식 (Batch and Two-phase system)에서 형성된 복합체의 열전이 특성에 대한 용매의 효과

(Ceramide (30 mg) was dissolved in different amounts of ethanol (0.5-2.0 mL) for the batch system or isopropyl ether (25-35 mL) for the two-phase system.)

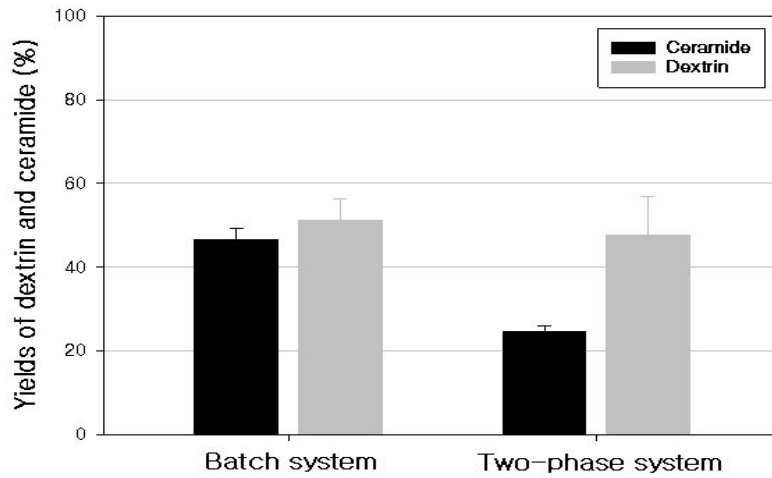
- 상기 [그림 8]은 2가지 서로 다른 방식을 통해 세라마이드와 텍스트린 분자들간의 상호작용을 통한 복합체 형성을 유도하였을 때의 DSC 결과이다.
- 전체적인 결과가 [그림 7]의 XRD 결과와 유사한 경향성을 보였다.
- 복합체 형성 방법에 관계없이 2개의 피크가 관찰되었다. 첫 번째 피크 (약 84°C 부근)는 복합체 형성에 참여하지 못한 세라마이드의 용점에 해당하며, 두 번째 피크 (약 105°C 부근)는 텍스트린-세라마이드 복합체의 용점에 해당한다.
- 상기 [그림 6]에서처럼 DSC상에서도 유기용매와 텍스트린간의 복합체가 일부 형성되었음을 관찰할 수 있었다 (약 105°C 부근). 하지만, 세라마이드와 텍스트린간에 형성된 복합체에 비해 상대적으로 낮은 엔탈피 값 ( $\Delta H = 0.98 \text{ J/g}$  in the batch system,  $\Delta H = 0.53 \text{ J/g}$  in the two-phase system)을 보여 세라마이드의 존재하에서 복합체들간의 구조적인 차이를 나타낸다고 할 수 있다. 또한 이러한 엔탈피 값은 XRD상에서의 peak intensity에서 보여지는 결정성과 일치한다고 할 수 있다. 이러한 값은 에탄올 혹은 이소프로필 에테르의 함량이 더 적을 때 더 높게 나타났다.



[그림 9] Batch system 상에서 복합체를 형성할 때 반응 온도에 따른 열전이 특성의 변화  
 (The complex formation process was performed at 50, 70 or 90°C for 2 days followed by storage at 25°C for 1 day. Ceramide (30mg) was dissolved in 0.5 mL of ethanol to be used in the complex formation.)

- DSC상에서도 XRD에서와 마찬가지로 반응 온도에 따라 다른 열전이 특성을 보였다.
- 50~70°C의 온도에서 복합체 형성을 유도하였을 때 엔탈피 값은 0.31~3.83 J/g으로 나타났다. XRD 결과와 유사하게 상대적으로 낮은 50°C의 온도에서 더 높은 엔탈피 값을 보였다. 하지만 90°C에서는 뚜렷한 복합체의 피크가 관찰되지 않았다.

라. 덱스트린과 세라마이드의 수율



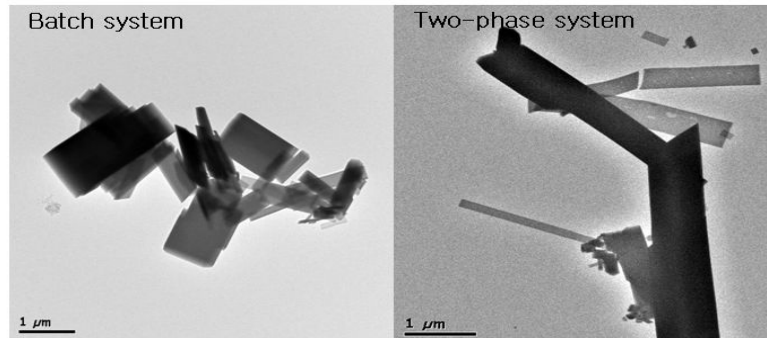
[그림 10] 최적의 batch and two-phase 방식으로 형성된 복합체내의  
덱스트린과 세라마이드의 수율

(• batch (0.5 mL EtOH, 50°C for 2days) • two-phase systems (25 mL isopropyl ether, 50°C for 2 days))

- 상기 [그림 10]은 복합체 형성에 참여하는 덱스트린과 세라마이드의 수율을 나타내고 있다. 이러한 수율은 앞서 실험한 결과를 바탕으로 2가지 복합체 형성방법에 있어 최적의 조건들을 가지고 계산하였다. 즉, Batch system의 경우 0.5 mL의 에탄올, Two-phase system의 경우 25 mL의 이소프로필 에테르를 이용하여 세라마이드를 녹였고, 50°C에서 이틀 동안 강한 교반을 통한 반응 후 25°C에서 하루 동안 저장한 후 회수된 시료의 수율을 계산하였다.

- 덱스트린 수율의 경우 2가지 방식에 있어서 큰 차이를 보이지 않았다 (51.2 mg/100 mg in the batch system, 47.8 mg/100 mg in the two-phase system, respectively). 반면에 세라마이드의 수율은 batch system이 two-phase system에서보다 약 2배 정도 더 높게 나타났다 (46.7 mg/100 mg in the batch system, 23.3 mg/100 mg in the two-phase system, respectively). 이는 batch system이 덱스트린 안으로 세라마이드 분자들을 포접하여 복합체를 형성하는데 더 효과적임을 나타내는 결과이다.

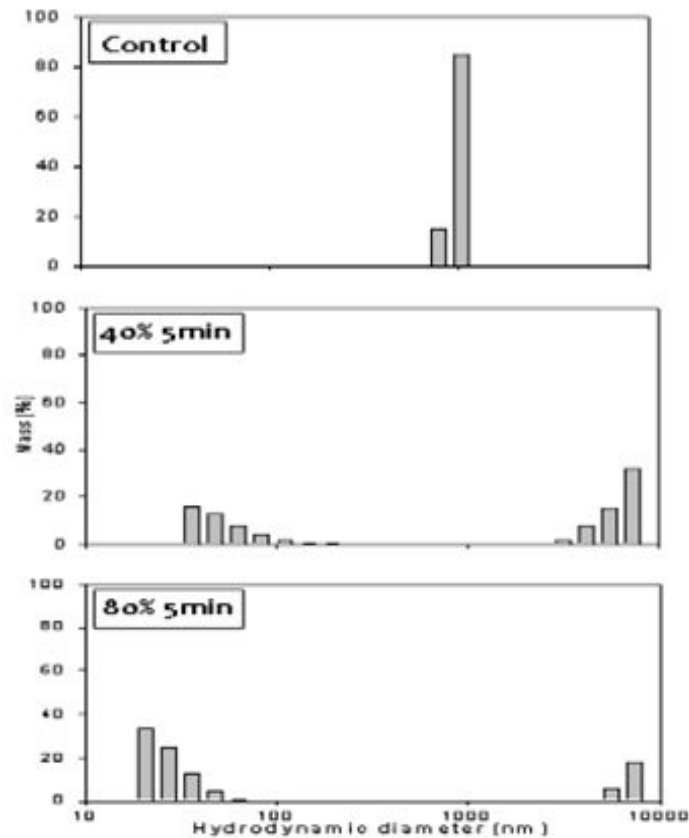
마. 나노전분복합체의 morphology 및 입도크기



[그림 11] 두가지 다른 방식 (Batch and Two-phase system)에 의해 형성된 복합체의 동결투과전자현미경 사진

- 상기 [그림 11]은 복합체 형성에 있어 최적조건의 샘플들의 morphology를 동결투과전자현미경을 통해 관찰한 결과이다.
- 서로다른 2가지 방식은 morphology에 있어서도 차이를 보였다. Batch system에서 형성된 복합체의 경우 상대적으로 더욱 균일한 약 1  $\mu\text{m}$ 의 직경을 갖는 입자분포를 보였다. 반면 Two-phase system을 통해 형성된 복합체는 1~3  $\mu\text{m}$ 의 다양한 범위의 직경을 갖고 있었으며, 다양한 관형의 혼합물 형태를 보였다.
- Lesmes et al. (2009)의 보고에 따르면, V-amylose crystals의 morphology는 guest compound의 구조와 복합체 형성 방법에 따라 다르게 나타나며 마이크로 영역의 입자들로 회수된다고 하였다.
- 반응 후 하루 동안의 저장을 통해 침전물의 형태로 복합체를 회수하였으므로 마이크로 단위의 입자분포를 보이는 것은 자연스러운 결과라고 사료된다. 더 나아가, 회수된 복합체의 건조과정 (TEM 관찰을 위한 전처리과정)이 aggregation을 유도하였을 것으로 추정되며 이러한 과정이 입자들의 모양과 크기에 영향을 미쳤을 것으로 판단된다.

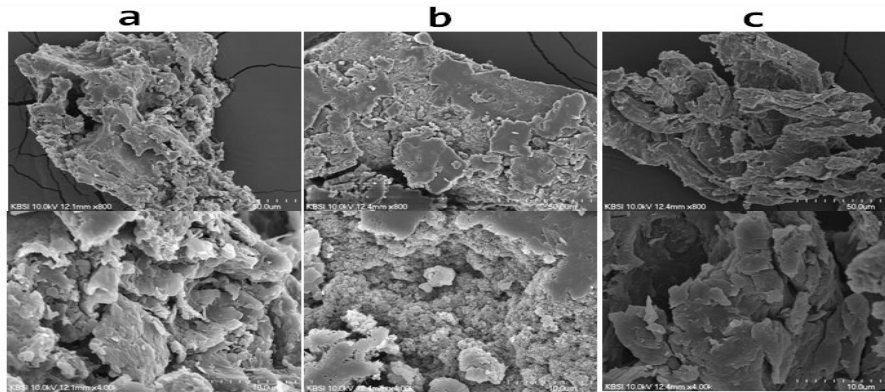
바. 나노 분쇄 및 파쇄에 의한 건조입자의 입도 감소 효과 분석



[그림 12] Batch 방식으로 형성된 복합체에 초음파 처리를 하였을 때의 입도 분포 변화  
(Complex was formed in the batch system (0.5 mL EtOH 50°C for 2 days))

- 상기 [그림 12]는 Batch system에서 형성된 복합체의 입도분포를 Dynamic Light Scattering(DLS)을 이용하여 측정된 결과이다.
- ‘Control’이라고 명시되어 있는 샘플은 초음파 처리를 하지 않은 것으로, TEM 상에서의 관찰과 유사하게 약 1  $\mu\text{m}$ 의 직경을 갖는 입자분포도를 보였다. 그러나, 초음파 처리 이후 마이크로 영역대의 입자들이 나노 사이즈로 줄어드는 것을 관찰할 수 있었다. 특히 진폭을 40%에서 80%로 올린 경우, 동일한 시간 (5분)동안 처리했음에도 불구하고 100 nm 이하의 입자들의 함량이 증가하는 것을 관찰할 수 있었다. 40% 진폭으로 5분간 초음파 처리한 시료의 경우 약 43%가 100 nm 이하의 입자들로 구성되어 있는 반면 80% 진폭으로 5분간 초음파 처리하였을 때는 약 77%가 100 nm 이하의 나노 입자임을 확인하였다. 나머지 23%에 해당하는 입자는 마이크로 단위였는데 이는 초음파 처리를 가해도 깨지지 않을 정도로 강하게 분자들이 결합되어 있는 시료이거나 초음파 처리 중의 aggregation된 입자로 추정된다.

## 사. 다양한 건조방법을 활용한 입자의 영김 방지 효과 분석



[그림 13] 다양한 건조방법에 따른 세라마이드-덱스트린 복합체의 주사전자현미경 사진  
(a; freeze-drying, b; vacuum-drying, c; air-drying)

- 상기 [그림 13]은 다양한 건조방법을 이용하여 복합체를 건조시켰을 때의 입자의 영김 정도의 효과를 분석한 결과이다. 복합체 시료는 Batch system을 이용 (0.5 mL 에탄올 이용, 50°C, 24시간)하여 형성된 것을 활용하였으며 건조는 동결건조 (-80°C, 24시간), 진공건조 (40°C, 24시간), 후드건조 (25°C, 24시간)로 각각 진행하여 비교하였다. 위의 사진은 800배 확대 아래 사진은 4000배 확대한 것이다.
- 정도의 차이는 있지만 건조 방법에 상관없이 모든 복합체 샘플들은 aggregation 되어있는 형태였다. 이는 입자들 서로가 뭉치려는 전분 고유의 성질에 기인하는 것으로 추정된다. 특히 동결건조된 복합체 시료의 경우 더욱 견고한 구조를 형성하고 있는 것으로 보인다. 입자의 영김을 막기 위해서는 초음파 분쇄기 또는 호모게나이저를 이용한 물리적 처리가 병행되어야 할 것으로 사료된다.

## 3절. 나노 전분 복합체 제조기술의 표준화

### 1. 경제성 있는 제조공정 개선

#### 가. 재료 및 방법

##### (1) 실험재료

##### (가) 옥수수 전분 (Normal corn starch)

25%의 아밀로즈 함량을 가지고 있는 옥수수 전분을 삼양제넥스 (Samyang Genex Inc., Seoul, Korea)에서 제공받아 실험에 사용하였다. 덱스트린의 경우 고아밀로즈 전분의 덱스트린화 및 정제화 과정 등의 공정이 요구되며 복합체 형성에 관여하는 세라마이드 수율이 약 45%임을 고려할 때 덱스트린 이외의 새로운 물질과의 복합체 형성 가능성

타진이 필요하다고 판단되었다.

(나) 덱스트린 (Dextrin, DP<sub>n</sub> 311)

▪ 70 % 이상의 아밀로즈 함량을 가지고 있는 고아밀로즈 전분 (Hylon VII)을 National Starch & Chemical company (Bridgewater, NJ, USA)로부터 구입하여 실험재료로 사용하였다.

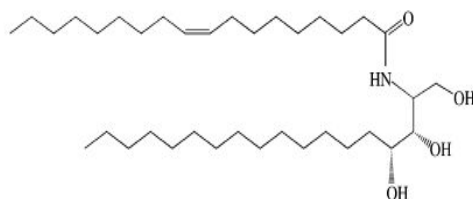
고아밀로즈 전분을 이용한 덱스트린의 제조는 Robyt et al. (1996)의 방법을 따랐다. 고아밀로즈 전분 (25g, dry basis)을 무수알코올 (100 mL)에 분산시킨 후 0.36% (v/v) HCl (약 1mL)을 첨가하여 20℃에서 전분의 가수분해를 시작하였다. 72시간 후 원심분리 (3,500 rpm, 10 min)를 통해 침전물을 회수하였고 70% 에탄올을 이용하여 2회의 세척과정 및 건조과정 (40℃, 24시간)을 통해 DP<sub>n</sub> 311의 덱스트린을 제조하였다.

▪ 덱스트린 내에 존재하는 lipid와 덱스트린간의 복합체 형성을 막기 위한 정제화 과정 (Defatting)은 기존의 잘 알려진 DMSO를 활용한 방법 대신 NaOH를 이용한 공정을 새롭게 개발하여 사용하였다. 이는 추후 덱스트린-세라미드 복합체를 식품의 소재로 활용할 수 있기 위함이다.

덱스트린 (20g, dry basis)을 NaOH 용액 (1M, 200mL)에 분산 시킨 후 교반과정을 통해 녹인 후 800mL의 물을 넣어 희석시켰다. 그 후 NaOH와 동량의 HCl (1M)을 넣어 덱스트린 용액을 중화시켰다. 완전한 용해를 위해 덱스트린 용액의 Autoclave 처리 (121℃, 20분)를 진행하였으며 95% 에탄올 (3L)을 이용해 덱스트린의 침전을 유도하였다. 원심분리 과정 (3,500 rpm, 10 min)을 통해 침전물의 형태로 회수된 덱스트린은 70% 에탄올을 이용하여 2회에 걸쳐 세척하였으며, 실온의 후드 상에서 건조시켜 분말형태의 덱스트린을 얻었다.

(다) 세라미드 (Ceramide)

- 명칭: DS-CERAMIDE-Y30 (N-Oleoylphytosphingosine)
- 순도: 95.0%
- 형태: 분말
- 화학식: C<sub>36</sub>H<sub>71</sub>NO<sub>4</sub>
- 구조: 스펡고신에 지방산이 연결되어 있는 구조를 가지고 있는 스펡고지질의 일종 (하단의 그림 참고)



[그림 1] 세라미드의 분자 구조



- 융점: 약 84°C
- 분자량: 582
- 물에 대한 용해도: 불용성



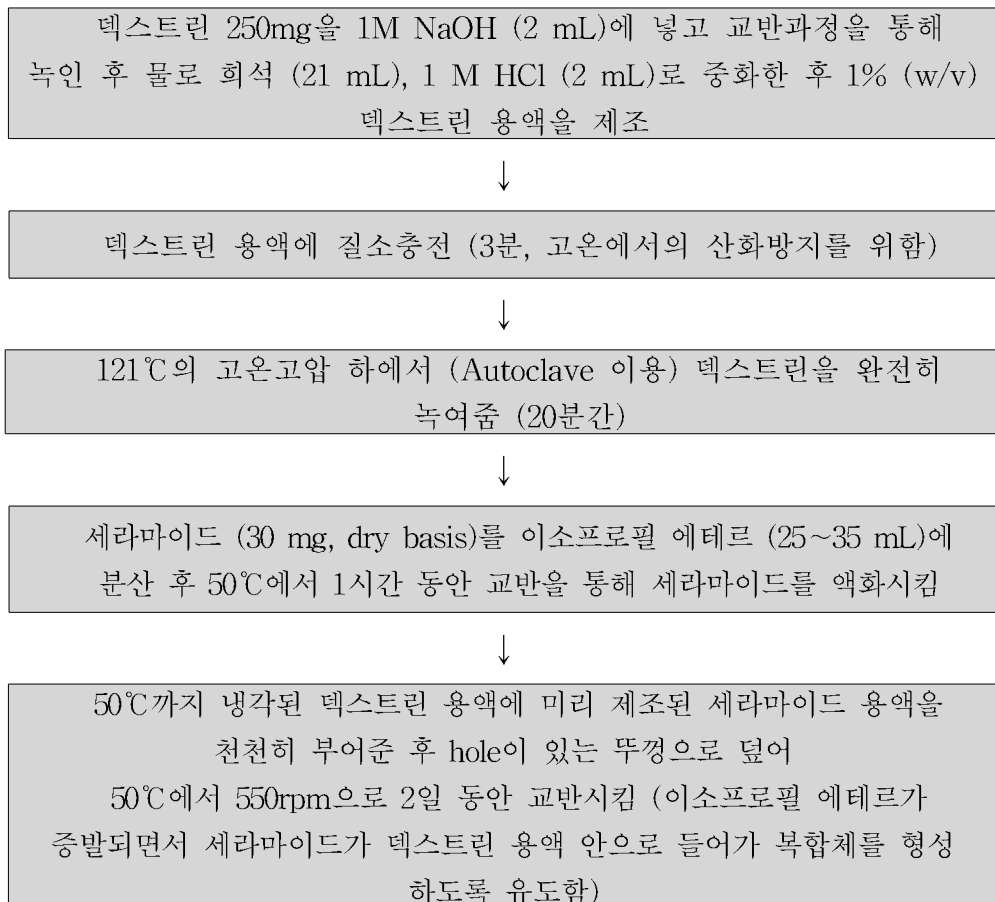
[그림 2] 물에 분산된 세라마이드 모습

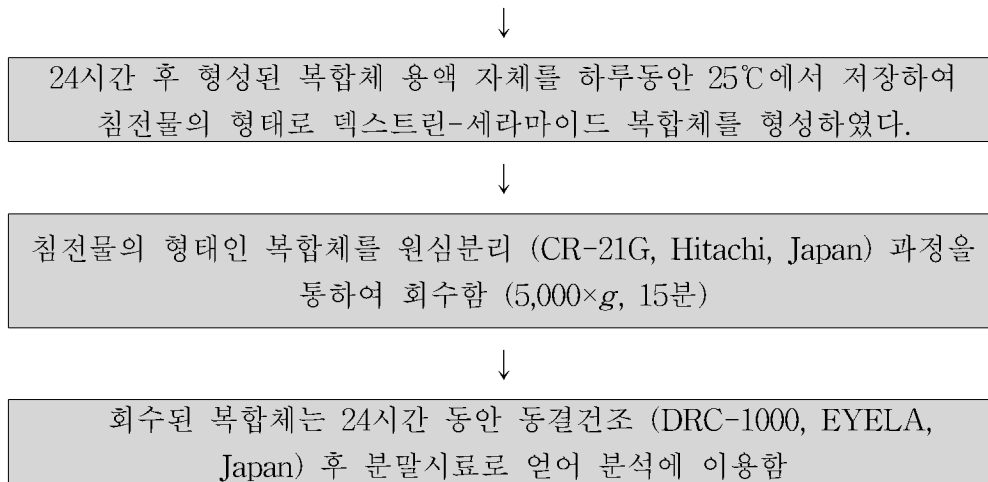
- 기능: 피부 각질층을 구성하는 각질 세포간 지질 중 40~60%를 차지하며, 수분 증발을 억제하는 지질 방어벽 역할과 각질층의 정연한 구조를 유지하게 하는 기능을 가지고 있다.

## (2) 세라마이드 나노 전분 복합체 형성 방법

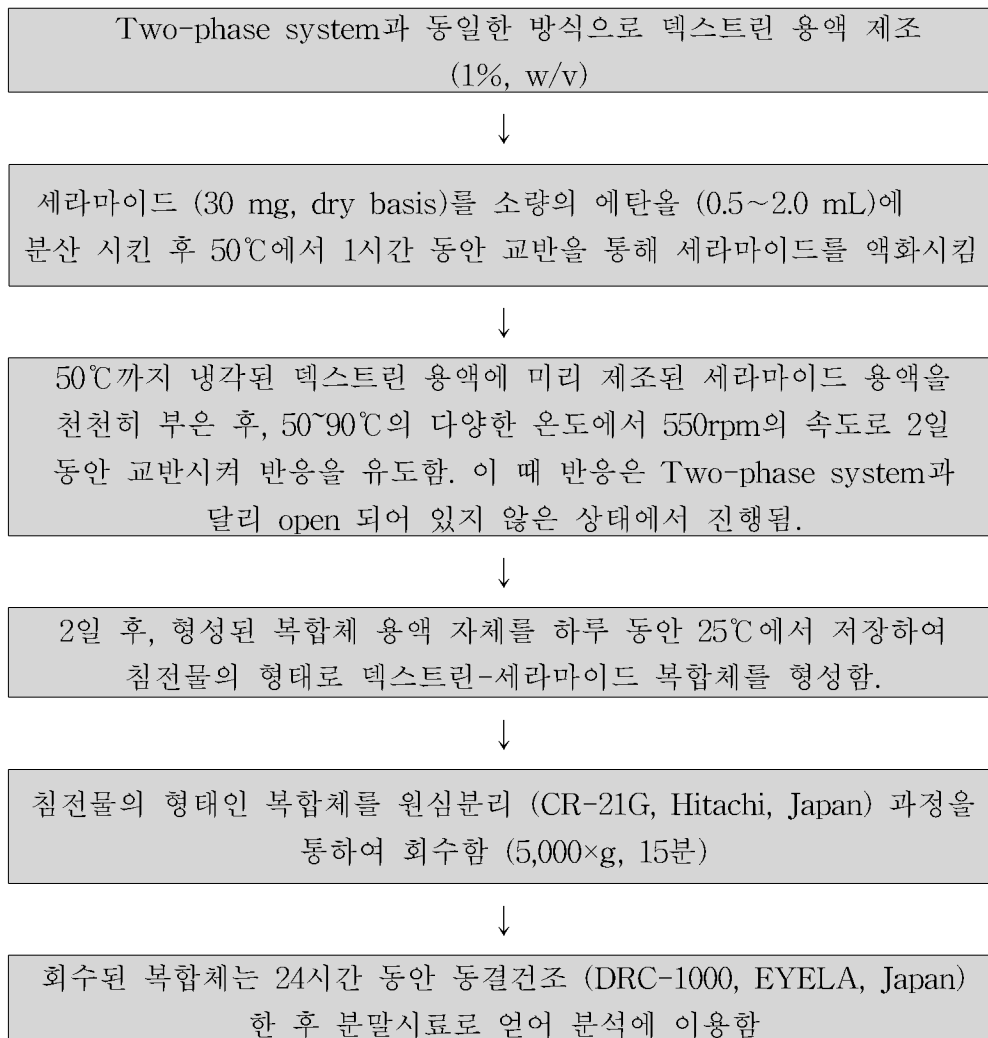
### (가) 텍스트린을 활용한 세라마이드 나노 전분 복합체 형성

#### (1) Two-phase system

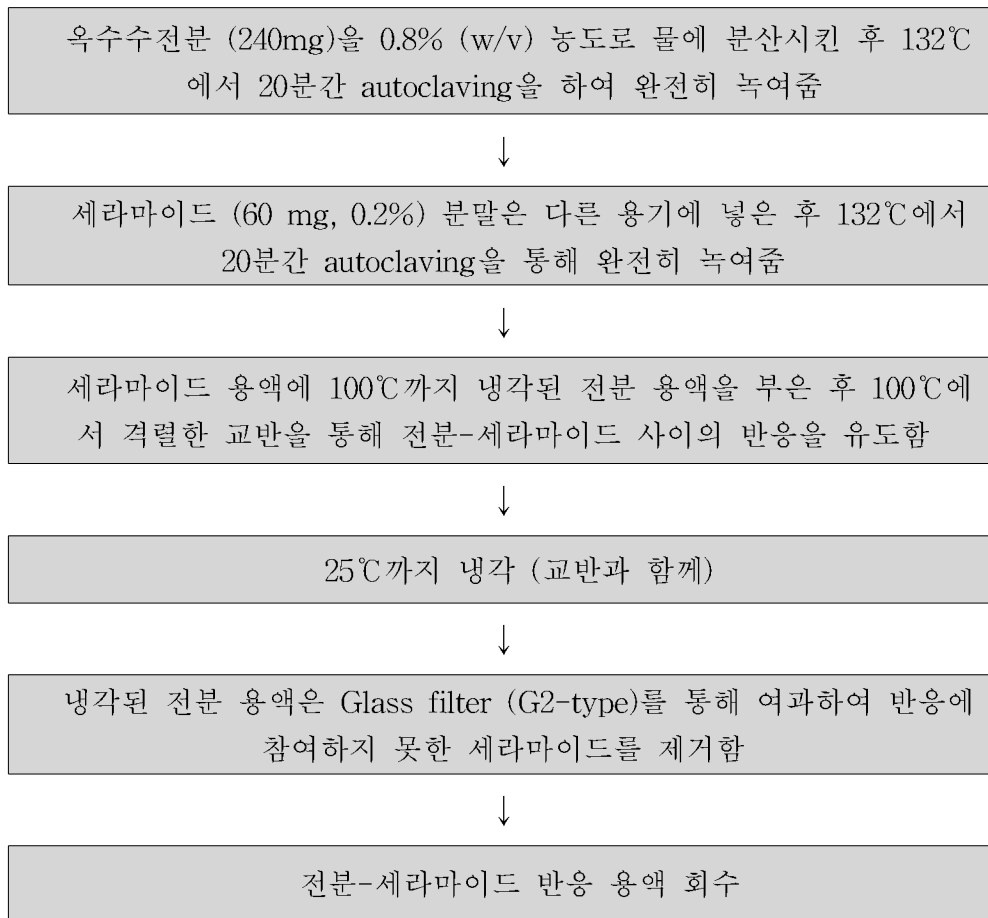




(2) Batch system



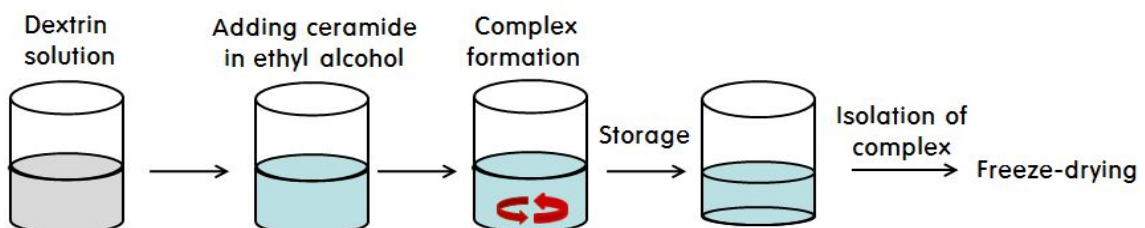
(나) 전분을 활용한 세라마이드 나노 전분 복합체 형성



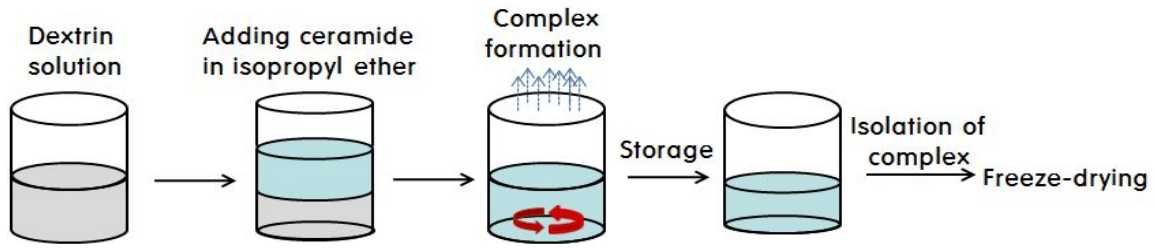
(다) 복합체 형성 유도 모식도

① 덱스트린-세라미드 복합체 형성

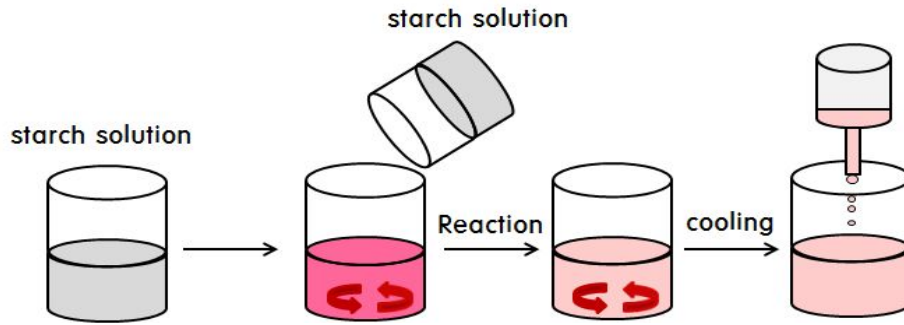
㉠ Batch system



㉡ Two-phase system (organic/aqueous)



② 전분-세라미드 복합체 형성



[그림 3] 덱스트린 또는 전분과 세라미드 간의 복합체 형성 유도 과정에 대한 모식도

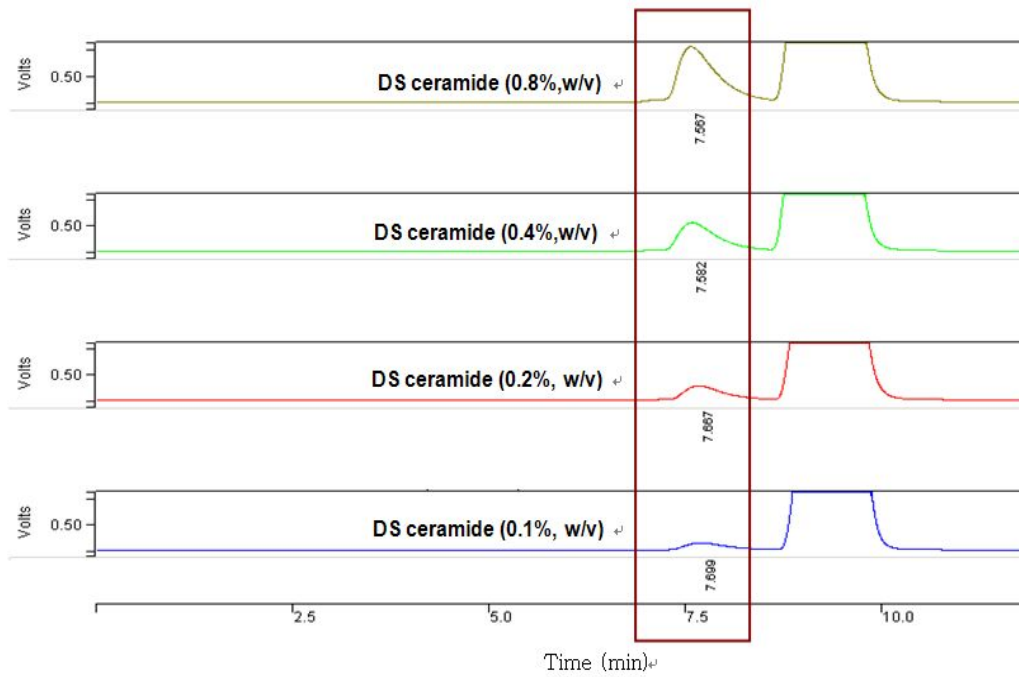
나. 형성된 복합체의 이화학적 특성 분석

(1) 세라미드 함량

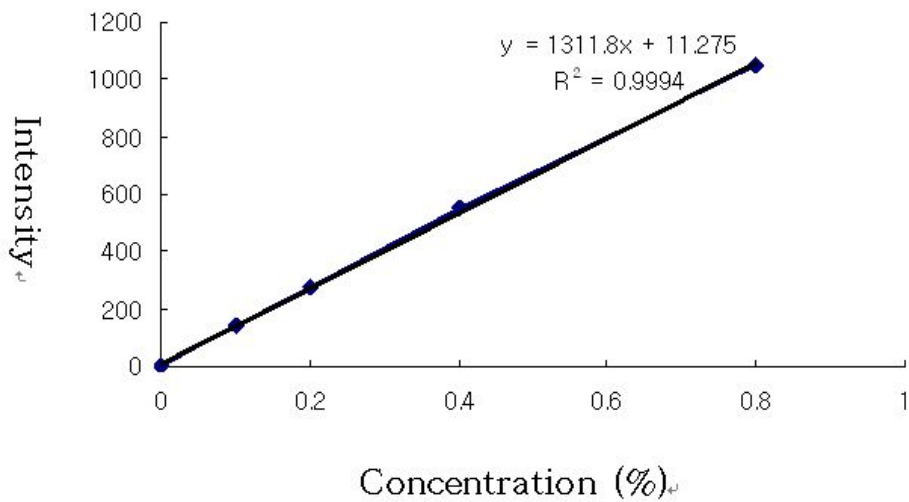
분말 시료 형태로 얻어진 복합체를 isopropyl alcohol에 재분산 시킨 다음 50℃에서 1시간 동안 교반과정을 통해 복합체 안에 존재하는 세라미드를 추출한 후 HPLC를 이용해 정량하였다.

(가) HPLC-RI 조건

- 검출기: Refractive Index (Shodex RI-71, Tokyo, Japan)
- 이동상: Isopropyl alcohol/water mixture (7:3, v/v)
- 유속: 0.4 mL/min
- 컬럼: TSK Gel silica-60 (Tosoh Bioscience, Montgomeryville, PA, USA)

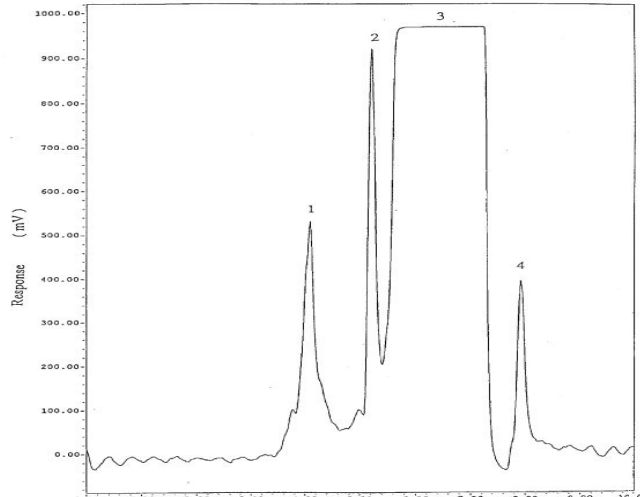


[그림 4] HPLC-RI 시스템을 이용한 농도에 따른 세라마이드 함량 분석



[그림 5] 세라마이드의 검정 곡선

- 농도가 증가함에 따라 7.6 분대의 피크가 증가하는 것을 확인할 수 있었고 (그림 4), 이는 세라마이드 피크임을 알 수 있었다. 한편 9분대에 나타나는 큰 피크는 세라마이드 제품안에 존재하는 스펙고 리피드로 추정되며, 이는 아래 문헌상에서 확인하였다 (McNabb et al., 1999).



[그림 6] Chromatograms of lipid extracts from yeast obtained by MaNabb et al. (27). Lipids were separated on a silica gel column and a mobile phase of chloroform/ethanol/triethylamine/formic acid and detected using an ELSD detector. Peaks: 1, hydroxy fatty acids ceramide; 2, C-2 ceramide; 3, sphingolipid; 4, phytosphingosine. Peaks were identified by comparison of retention times to those of pure authentic standards.

(2) 입자 분포도 (Particle size distribution)

- Dynamic light scattering detector (Dynapro titan, Wyatt Technology, Santa Barbara, CA)
- Refractive index: 1.333 (20°C)
- Viscosity: 1.00 cP (20°C)

(3) 제타전위 (Zeta-potential)

- Zeta-sizer 3000HS Advance (Malvern Instrument GmbH, UK)

(4) Water-dispersability

- I) 파우더 형태의 복합체 (80mg, dry basis)를 물 (40 mL)에 분산시킨 후 25°C 또는 50°C의 온도에서 총 3시간 동안 교반시킴
- ii) 분산액을 실온에서 24시간 동안 보관
- iii) 원심분리(5000 x g, 15 min) 과정을 통해 상등액 회수 (침전물 제거)
- iv) 상등액에 분산된 세라마이드 함량 분석 (HPLC-RI system)

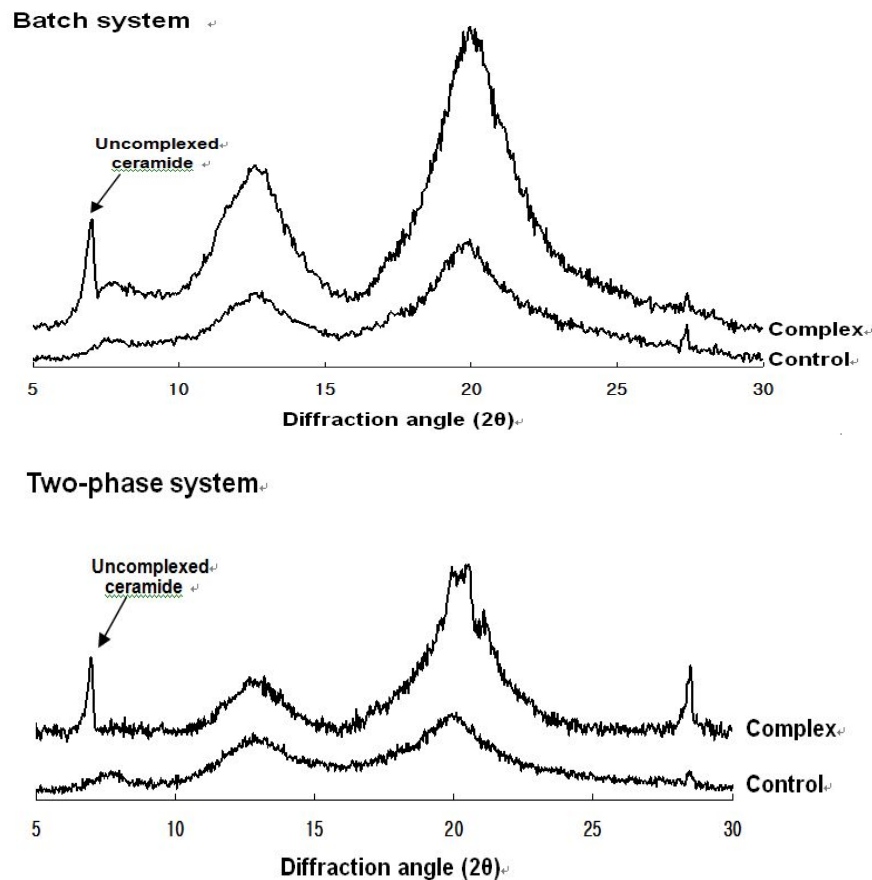
## 다. 결과 및 고찰

### (1) 효율적 제조 공정 확립 및 수율의 극대화

#### (가) 전분을 활용한 세라마이드 복합체 형성

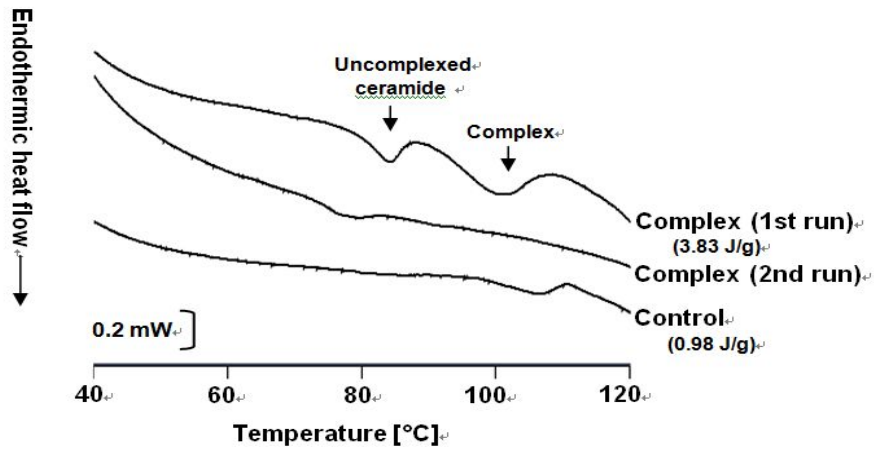
2차년에 수행한 결과들을 바탕으로 좀 더 경제적인 복합체 제조 공정을 확립하고 수율을 극대화하기 위해 연구하였다.

- 2차년에는 2가지 서로 다른 방식인 Batch system과 Two-phase system을 통해 고아밀로즈 (70% 아밀로즈함량)로부터 유래된 텍스트린과 소수성을 갖는 세라마이드의 복합체 형성에 성공하였다. 이는 그림 7과 8의 XRD와 DSC 분석을 통해 확인되었다. 하지만 긴 반응시간 (총 48시간)과 냉각시간 (총 24시간, 형성된 복합체의 구조를 더욱 견고하게 유지하기 위해 필요함)이 소요되는 제조공정 상의 단점이 있었다. 이와 더불어 실험 재료로 사용되는 텍스트린의 경우 고아밀로즈 전분의 텍스트린화 및 정제화 과정 등을 거치는 동안 3일 이상의 긴 시간이 소요되었다. 또한 복합체 형성에 참여한 세라마이드의 수율 [그림 9]이 상대적으로 높지 않았다 (Batch system: 46.7%, Two-phase system: 24.7%).

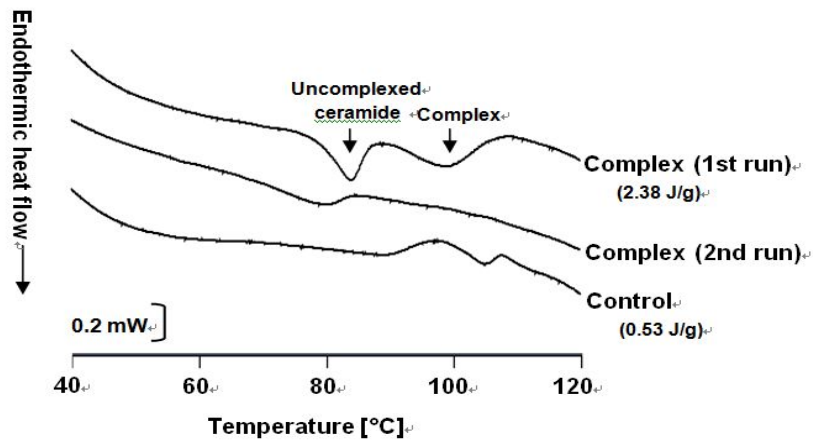


[그림 7] 두가지 다른 방식 (Batch and Two-phase system)을 통해 형성된 텍스트린-세라마이드 복합체 및 대조군의 X선 회절패턴

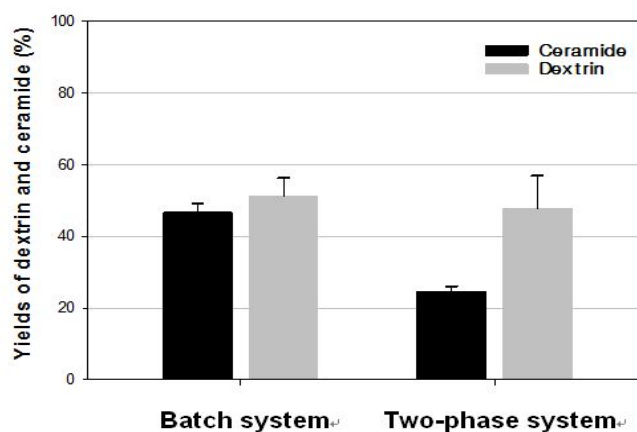
### Batch system



### Two-phase system



[그림 8] 두가지 다른 방식 (Batch and Two-phase system)을 통해 형성된 텍스트린-세라마이드 복합체 및 대조군의 열전이 특성



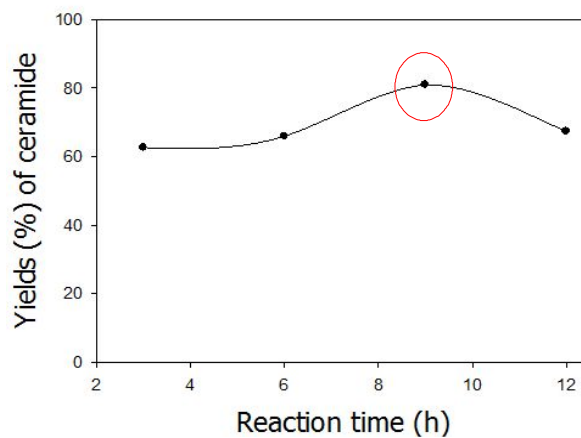
[그림 9] 두가지 다른 방식 (Batch and Two-phase system)을 통해 형성된 텍스트린-세라마이드 복합체 안에 존재하는 세라마이드 및 텍스트린 함량

- 이에 텍스트린과는 다른 구조 및 특성을 지니고 있는 전분을 활용한 세라마이드 복합체 형성을 새롭게 시도해 보았다. 아밀로즈 함량이 거의 없는 찹옥수수 전분부터 아밀로



즈 함량이 높은 (약 70%)의 고아밀로즈 옥수수 전분까지 다양한 전분들을 복합체 형성의 소재로 활용해 보았다. 하지만 아밀로즈 함량이 중간 정도에 해당하는 옥수수전분 (아밀로즈 함량 25%)이 복합체 형성에 가장 효과적이었다. 천연의 전분을 실험에 활용함으로써 기존의 텍스트린 제조에 소요되던 3일의 시간을 단축할 수 있어 효율적인 공정 확립에 기여하였다.

- 한편 기존에 사용하였던 반응 온도 (50℃)는 높은 융점 (84℃)을 갖는 세라마이드를 에탄올 없이 액화시켜 효과적으로 복합체 형성을 유도하는데 한계가 있었다. 따라서 본 실험은 반응 온도를 (100℃)로 높여 진행하였으며, 이는 제조 시간 단축 (24시간→ 9시간) 및 에탄올과 같은 유기용매의 불필요 등의 개선 효과를 나타내었다.



[그림 10] 반응시간에 따른 세라마이드의 수율(%)

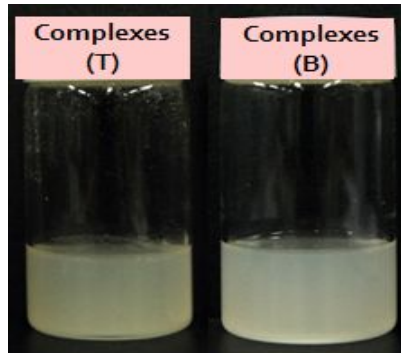
- [그림 10]에서 보듯 반응시간에 따라 복합체 형성에 참여하는 세라마이드의 양이 변화함을 알 수 있다. 전체적으로 60% 이상의 높은 수율 (기존 텍스트린과 함께 복합체 형성에 참여한 세라마이드 수율은 최대 46.7% 이었음)을 보였으며 특히 9시간의 반응 후 가장 많은 세라마이드 함량 (81.0%)을 보였다.

- 반응수율을 높이하고자 첨가했던 propylene glycol (PG)와 glycerol 그리고 냉각 중의 초음파 처리는 효과적으로 세라마이드의 수율을 높이는데 크게 기여하지 못했다.

## 2. 제품의 분산안정성 확립

### 가. 전분-세라마이드 복합체의 분산성

- 2차년에 수행한 두가지 방식을 통해 형성된 복합체 용액은 [그림 11]에서 보는 것과 같이 반응 직후에는 비교적 안정한 형태로 존재하였다. 하지만 24시간의 저장기간 (형성된 복합체의 구조를 더욱 견고하기 위해 필요한 과정)을 거치면서 복합체의 크기가 마이크로 단위로 증가되었고 침전되는 양상을 띠었다.



[그림 11] 두가지 다른 방식 (Batch and Two-Phase system)을 통해 형성된 복합체 용액 (반응 직후)

- 이에 본 실험에서는 반응에 참여하지 못한 세라미이드 혹은 전분 입자를 제거하는 과정을 추가하여 복합체 용액의 분산성을 향상시키고자 시도해보았다. 반응에 참여하지 못한 입자들은 glass filter (G2-type) 위에 남아있었고 여과액만을 회수하였다. 여과과정을 거쳤지만 세라미이드의 수율은 81%까지 나타났고 분산 및 저장 안정성 또한 높아서 11일이 경과된 후에도 반응 직후와 차이가 없었다.

[표 1] 전분-세라미이드 복합체 용액의 저장기간에 따른 입도 및 제타전위 값의 변화 정도

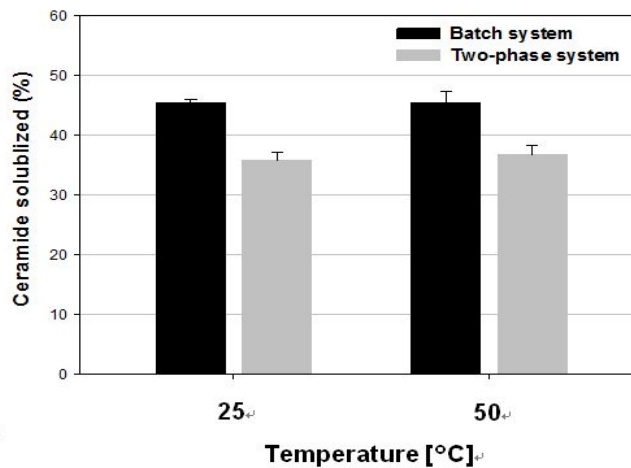
Storage period (day)	Particle size (nm)		Zeta-potential (mV)
	Peak 1	Peak 2	
0	432.7	64.9	-6.24±0.75
4	436.7	56.4	-7.45±1.18
11	453.1	63.4	-9.6±0.79

- 반응직후 복합체 용액은 직경 432.7 nm와 64.9 nm에서 두 개의 피크를 갖는 것으로 관찰되었다. 한편 가까이 있는 입자들 사이의 반발력을 의미하며 분산안정성과 관련이 있는 제타전위 값은 -6.24 mV로 나타났다. 일반적으로 입자의 크기가 작은 경우 30 mV (음 또는 양의 값) 이상의 제타전위 값을 가질 때 분산액이 안정하다고 알려져 있다 (ASTM, 1985). 문헌상과 비교해 볼 때 본 실험에서 확인된 제타전위 값은 비교적 낮지만 저장기간에 따라 오히려 증가하며 특별한 침전양상이 관찰되지 않는다는 측면에서 고려해볼 때 안정한 용액이라고 할 수 있다.

- 한편 이러한 복합체 용액은 일주일 이상 실온에서 저장함에도 불구하고 입도의 뚜렷한 증가나 제타전위의 감소가 나타나지 않았다. 이는 본 실험에서 제조된 전분-세라미이드 복합체가 높은 저장안정성을 보인다는 증거라고 할 수 있다.

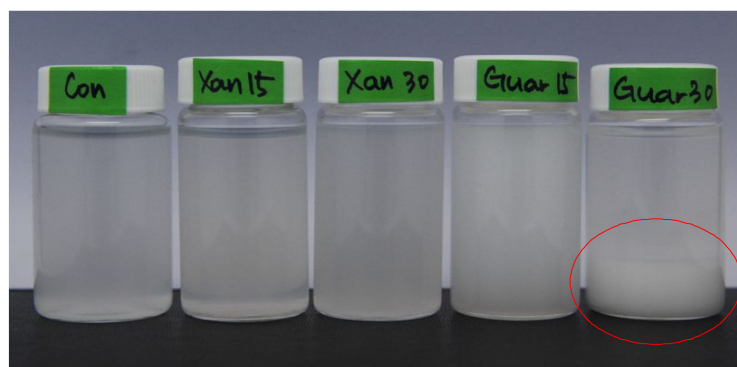
나. 덱스트린-세라마이드 복합체의 분산성

- 한편 복합체 형성을 통해 세라마이드가 어느 정도 수용화 되었는지 또한 확인해보았다. [그림 12]에서 확인된 바와 같이 분말 형태의 복합체는 물에 대한 뛰어난 분산력을 보여주었다 (35.8~45.5%의 세라마이드가 물에 분산된 것으로 확인됨).
- 앞서 복합체 안에 존재하는 세라마이드의 높은 수율을 보였던 Batch-system의 경우 물에 대한 분산력 또한 더욱 높은 것으로 나타났다. 반면, 온도는 세라마이드의 물에 대한 분산력에 큰 영향을 미치지 않은 것으로 사료된다.
- 물에 대한 높은 분산력을 보인 복합체 용액은 특별한 침전 양상을 보이지 않고 1주일 간 안정한 상태로 유지되었다.
- 본 실험은 소수성을 가지고 있으며 물에 대한 분산력이 없는 세라마이드라는 기능성 물질이 덱스트린과 복합체를 형성함으로써 물에 대한 분산력을 가진다는 점에서 의미가 있다고 판단된다.



[그림 12] 물에 분산된 복합체 안에 존재하는 세라마이드의 함량 (%)

다. 검류의 첨가에 의한 덱스트린-세라마이드 복합체의 분산성 향상



[그림 13] 덱스트린-세라마이드 복합체 용액의 분산 안정성을 높이기 위해 첨가한 검류 (Xanthan gum, Guar gum)의 효과  
(Xan 15 및 Guar 15는 용액의 0.05%, Xan 30 및 Guar 30은 용액의 0.1%에 해당하는 검을 각각 첨가한 것을 의미한다.)

- 반응 중간 (5시간)에 분산안정성을 높이고자 첨가한 검류 (xanthan gum, guar gum)는 농도에 따라 다른 양상을 보였다. 검류의 종류와 관계없이 0.05%는 대조군 (검류를 첨가하지 않은 군)과 크게 다르지 않은 분산안정성을 보였다. 반면 0.1% 농도로 첨가된 guar gum의 경우 시간이 경과함에 따라 점점 침전되는 양상을 보였다. 0.1% 농도의 검류 특히 guar gum의 첨가는 복합체 용액의 분산안정성을 저해하는 것으로 사료된다. 하지만 한달동안 실온에서 보관하였을 때는 다른 양상을 보였다. 대조군 및 초기에도 뚜렷한 침전 양상을 보였던 Guar 30 이외에도 Xan 15, Xan 30 모두 복합체가 침전되는 양상을 보였다. 반면 Guar 15 (0.05% 첨가)의 경우는 어떠한 침전물도 관찰되지 않아 상당히 높은 분산성을 보이고 있었다.

## 4절. 나노 전분 복합체의 안전성 평가

### 1. SD 랫드에 대한 세라마이드 나노전분 복합체의 단회 경구투여 독성시험

#### 가. 재료 및 방법

##### (1) 시험물질 및 대조물질

(가) 시험물질 : 세라마이드-텍스트린 복합체

(나) 대조물질 (부형제) : 멸균증류수

##### (2) 시험물질 조제

시험물질을 칭량 후 200 mg/mL 용량으로 멸균증류수에 용해하여 조제한다.

##### (3) 시험계

(가) 동물종 (계통) : CrI:CD(SD)-Rat, SPF

(나) 공급원 : (주)오리엔트 바이오(경기도 가평군 북면 북동리 699-13)

(다) 구입동물수(성별), 주령 및 체중범위

30 마리(수컷)/30 마리(암컷), 5주령, 142.3~155.1 g / 94.7~114.3 g

(라) 투여시 동물수(성별), 주령 및 체중범위

25 마리(수컷)/25 마리(암컷), 6주령, 171.0~187.6 g / 124.5~135.7 g

(마) 시험계의 선택사유

본 시험에 사용될 랫드는 단회 및 반복투여 독성시험 등의 안전성시험에 널리 사용되고 있으며, 본 계통에 관한 풍부한 시험 기초 자료가 있어 시험결과의 해석 및 평가가 용이하여 선택하였다.

(바) 순화 및 검역

동물을 구입한 후 5일 동안 동물사육실의 환경하에서 검역 및 순화시키면서 일반 건강 상태를 관찰한 후 건강한 개체를 선별하여 시험에 사용하였다.

##### (4) 사육환경

(가) 환경

본 시험의 환경은 온도 21.9~22.2℃, 상대습도 49.5~50.8 %, 환기횟수 10~15회/hr, 조명시간 12시간 (오전8시~오후8시), 조도 200~300 Lux의 동물사육실에서 사료와 음용수를 급여하여 순화 및 시험기간 동안 격리 사육하였다.

(나) 사육조건

순화 및 시험기간 중 스테인레스제 사육상자 (500× 300× 200mm)에 5마리씩 넣어 사육하였다.

(다) 사료 및 음용수

사료는 방사선 (2.0 Mrad)멸균 된 실험동물용 쥐사료[(주)퓨리나코리아]를, 물은 자외선 살균처리 된 음용수를 자유섭취 시켰다.

(5) 시험군의 구성

본 시험의 시험물질 투여량은 식품의약품안전청 고시 중 “의약품등의 독성시험기준 해설서”에 근거하여 2000 mg/kg B.W. 용량으로 시험군을 설정하였으며, 대조군으로는 부형제인 멸균증류수를 투여하는 부형제 대조군을 두었다.

군	시험물질	성	동물번호	투여량 (mg/kg B.W.)	투여액량 (mL/kg B.W.)
1군 (G1)	멸균증류수	수컷	1101 ~ 1105	0	10
		암컷	2101 ~ 2105		
2군 (G2)	세라마이드 나노복합체	수컷	1201 ~ 1205	2,000	10
		암컷	2201 ~ 2205		

(6) 시험물질의 투여 경로 및 방법

시험물질인 세라마이드 나노전분 복합체의 경구 투여 시 나타나는 독성증상을 알아보기 위하여 경구 경로를 선택하여 투여하였고, 투여 전 날 절식 시킨 실험동물에 경구 투여용 주사기를 이용하여 위내에 1회 강제 투여하였다.

(7) 관찰항목

(가) 일반증상 관찰

전 동물에 대하여 투여 후 첫 30분 동안 각 개체별로 관찰하였으며, 매일 1회 이상 증상관찰을 실시하였다. 단 투여 당일에는 투여 후 4시간까지는 매시간 마다 관찰하였다. 일반 증상관찰은 투여 후 14일까지 실시하였다.

(나) 체중측정

체중은 입수시, 군분리시, 시험물질투여 개시 직전, 투여 개시 후 3일, 7일 및 14일째에 측정하였다.

(다) 부검시 육안적 소견

투여 후 14일째 모든 생존동물의 외관 검사를 실시한 다음, 에테르로 마취시킨 후 방혈 치사시켜서 부검하여 육안적으로 장기를 검사하였다.

(8) 통계처리

본 시험에서는 체중데이터에 대한 분산의 동질성을 비교하기 위하여 SPSS 통계프로그램을 이용하여 F 검정을 실시하였고, 분산의 동질성이 인정되어 student t test를 실시하였다.

나. 결과

(1) 사망율(표 1)

대조군을 포함한 모든 시험군에서 사망동물이 관찰되지 않았다.

(2) 일반증상관찰(표 2 and 부록 1, 2)

대조군을 포함한 모든 투여 동물에서 어떠한 이상증상도 관찰되지 않았다.

(3) 체중변화(표 3, 부록 3, 4)

시험기간 중 생존동물에 대한 체중변화에 있어서는 모든 시험동물에서 정상적인 체중증가가 관찰되었다.

(4) 부검결과(표 4, 부록 5, 6)

부검시 투여부위를 포함한 모든 개체의 주요장기에 대한 육안적 관찰 결과, 시험물질 투여와 관련된 이상 소견이 관찰된 동물은 없었다.

다. 고찰 및 결론

세라마이드 나노전분 복합체에 대한 단회 경구투여 독성시험을 조사하기 위하여 SD 랫드를 사용하여 투여용량인 2000 mg/kg B.W.으로 설정한 다음 1회 경구 투여한 후 14일간 사망률, 일반증상, 체중변화를 관찰하였다. 또한 부검을 수행하여 주요 장기에 대한 이상 유무를 검사하였다. 시험기간 중 투여와 관련된 사망동물 및 이상증상은 관찰되지 않았으며, 대조물질 투여군과 유의성있는 체중변화는 관찰되지 않았다. 또한 부검결과에 있어서도 투여와 관련된 이상소견도 인정되지 않았다. 이상의 결과로부터 SD 랫드에 세라마이드 나노전분 복합체를 단회 경구 투여시 시험물질 투여와 관련된 독성학적 소견이 인정되지 않았으므로 개략의 치사량치는 2000 mg/kg B.W.이상으로 판단된다.

[표 1] 사망률

Group	Dose (mg/kg)	Mortality (dead/total)	
		Male	Female
G1	0	0% (0 / 5) <sup>a</sup>	0% (0 / 5)
G2	2,000	0% (0 / 5)	0% (0 / 5)

<sup>a</sup> : No. of dead animals / No. of tested animals

[표 2] 일반증상관찰

Group	Dose (mg/kg)	Sex	Numberofanimal	ClinicalSigns
-------	-----------------	-----	----------------	---------------

G1	0	Male	5	No abnormality detected
		Female	5	
G2	2,000	Male	5	No abnormality detected
		Female	5	

[표 3] 체중변화

Unit : g

Group	Dose (mg/kg)	Sex	Day(s) after treatment			
			0	7	14	
G1	0	Male	Mean±S.D.	178.1±5.9	256.9±9.0	298.9±17.3
			N	5	5	5
		Female	Mean±S.D.	131.3±4.6	182.9±7.3	210.2±8.1
			N	5	5	5
G2	2,000	Male	Mean±S.D.	175.9±5.4	252.4±10.3	294.8±13.5
			N	5	5	5
		Female	Mean±S.D.	130.9±4.0	179.6±9.5	199.4±12.2
			N	5	5	5

N : Animal numbers

[표 4] 부검 소견

Findings	G1 0mg/kg		G2 2,000mg/kg	
	Male	Female	Male	Female
Number of Examined	5	5	5	5
No abnormalities detected	5	5	5	5

[부록 1] 수컷의 일반 증상

Group	Dose (mg/kg)	Animal No.	Hour(s) after administration					Day(s) after administration			
			30min	1hr	2hr	3hr	4hr	1	2	3	4
G1	0	1101	NAD	NAD	NAD	NAD	NAD	NAD	NAD	NAD	NAD
		1102	NAD	NAD	NAD	NAD	NAD	NAD	NAD	NAD	NAD
		1103	NAD	NAD	NAD	NAD	NAD	NAD	NAD	NAD	NAD
		1104	NAD	NAD	NAD	NAD	NAD	NAD	NAD	NAD	NAD
		1105	NAD	NAD	NAD	NAD	NAD	NAD	NAD	NAD	NAD

NAD: No Abnormality Detected

Group	Dose	Animal	Days after administration
-------	------	--------	---------------------------



	(mg/kg)	No.	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	
G1	0	1101	NAD	NAD	NAD	NAD	NAD	NAD	NAD	NAD	NAD	NAD	
		1102	NAD	NAD	NAD	NAD	NAD	NAD	NAD	NAD	NAD	NAD	
		1103	NAD	NAD	NAD	NAD	NAD	NAD	NAD	NAD	NAD	NAD	NAD
		1104	NAD	NAD	NAD	NAD	NAD	NAD	NAD	NAD	NAD	NAD	NAD
		1105	NAD	NAD	NAD	NAD	NAD	NAD	NAD	NAD	NAD	NAD	NAD

NAD: No Abnormality Detected

Group	Dose (mg/kg)	Animal No.	Hour(s)afteradministration					Day(s)afteradministration				
			30min	1hr	2hr	3hr	4hr	1	2	3	4	
G2	2,000	1201	NAD	NAD	NAD	NAD	NAD	NAD	NAD	NAD	NAD	NAD
		1202	NAD	NAD	NAD	NAD	NAD	NAD	NAD	NAD	NAD	NAD
		1203	NAD	NAD	NAD	NAD	NAD	NAD	NAD	NAD	NAD	NAD
		1204	NAD	NAD	NAD	NAD	NAD	NAD	NAD	NAD	NAD	NAD
		1205	NAD	NAD	NAD	NAD	NAD	NAD	NAD	NAD	NAD	NAD

NAD: No Abnormality Detected

Group	Dose (mg/kg)	Animal No.	Daysafteradministration										
			5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	
G2	2,000	1201	NAD	NAD	NAD	NAD	NAD	NAD	NAD	NAD	NAD	NAD	NAD
		1202	NAD	NAD	NAD	NAD	NAD	NAD	NAD	NAD	NAD	NAD	NAD
		1203	NAD	NAD	NAD	NAD	NAD	NAD	NAD	NAD	NAD	NAD	NAD
		1204	NAD	NAD	NAD	NAD	NAD	NAD	NAD	NAD	NAD	NAD	NAD
		1205	NAD	NAD	NAD	NAD	NAD	NAD	NAD	NAD	NAD	NAD	NAD

NAD: No Abnormality Detected

[부록 2] 암컷의 일반 증상

Group	Dose (mg/kg)	Animal No.	Hour(s)afteradministration					Day(s)afteradministration				
			30min	1hr	2hr	3hr	4hr	1	2	3	4	
G1	0	2101	NAD	NAD	NAD	NAD	NAD	NAD	NAD	NAD	NAD	NAD
		2102	NAD	NAD	NAD	NAD	NAD	NAD	NAD	NAD	NAD	NAD
		2103	NAD	NAD	NAD	NAD	NAD	NAD	NAD	NAD	NAD	NAD
		2104	NAD	NAD	NAD	NAD	NAD	NAD	NAD	NAD	NAD	NAD
		2105	NAD	NAD	NAD	NAD	NAD	NAD	NAD	NAD	NAD	NAD

NAD: No Abnormality Detected

Group	Dose (mg/kg)	Animal No.	Daysafteradministration										
			5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	
G1	0	2101	NAD	NAD	NAD	NAD	NAD	NAD	NAD	NAD	NAD	NAD	NAD
		2102	NAD	NAD	NAD	NAD	NAD	NAD	NAD	NAD	NAD	NAD	NAD
		2103	NAD	NAD	NAD	NAD	NAD	NAD	NAD	NAD	NAD	NAD	NAD
		2104	NAD	NAD	NAD	NAD	NAD	NAD	NAD	NAD	NAD	NAD	NAD
		2105	NAD	NAD	NAD	NAD	NAD	NAD	NAD	NAD	NAD	NAD	NAD

NAD: No Abnormality Detected

Group	Dose (mg/kg)	Animal No.	Hour(s)afteradministration					Day(s)afteradministration				
			30min	1hr	2hr	3hr	4hr	1	2	3	4	
G2	2,000	2201	NAD	NAD	NAD	NAD	NAD	NAD	NAD	NAD	NAD	NAD
		2202	NAD	NAD	NAD	NAD	NAD	NAD	NAD	NAD	NAD	NAD
		2203	NAD	NAD	NAD	NAD	NAD	NAD	NAD	NAD	NAD	NAD
		2204	NAD	NAD	NAD	NAD	NAD	NAD	NAD	NAD	NAD	NAD
		2205	NAD	NAD	NAD	NAD	NAD	NAD	NAD	NAD	NAD	NAD

NAD: No Abnormality Detected

Group	Dose (mg/kg)	Animal No.	Daysafteradministration										
			5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	
G2	2,000	2201	NAD	NAD	NAD	NAD	NAD	NAD	NAD	NAD	NAD	NAD	NAD
		2202	NAD	NAD	NAD	NAD	NAD	NAD	NAD	NAD	NAD	NAD	NAD
		2203	NAD	NAD	NAD	NAD	NAD	NAD	NAD	NAD	NAD	NAD	NAD
		2204	NAD	NAD	NAD	NAD	NAD	NAD	NAD	NAD	NAD	NAD	NAD
		2205	NAD	NAD	NAD	NAD	NAD	NAD	NAD	NAD	NAD	NAD	NAD

NAD: No Abnormality Detected

[부록 3] 수컷의 체중 변화

Unit : g

Group	Dose (mg/kg)	No.	Day(s)afteradministration		
			0	7	14
G1	0	1101	174.2	251.7	283.6
		1102	187.6	268.4	321.0
		1103	176.7	260.9	302.6
		1104	172.7	244.9	279.5
		1105	179.6	258.7	308.0
		Mean	178.1	256.9	298.0
		S.D.	5.9	9.0	17.3
G2	2,000	1201	171.0	239.9	283.6
		1202	172.5	256.3	303.4
		1203	178.2	248.9	285.0
		1204	173.7	249.2	287.6
		1205	184.4	267.6	314.3
		Mean	175.9	252.4	294.8
		S.D.	5.4	10.3	13.5

[부록 4] 암컷의 체중 변화

Unit : g

Group	Dose (mg/kg)	No.	Day(s)afteradministration		
			0	7	14
G1	0	2101	135.4	190.1	215.9
		2102	124.5	172.4	198.0
		2103	130.7	180.1	218.6
		2104	135.7	189.5	210.8
		2105	130.1	182.4	207.5
		Mean	131.3	182.9	210.2
		S.D.	4.6	7.3	8.1
G2	2,000	2201	126.0	167.5	180.8
		2202	134.6	191.3	211.9
		2203	131.3	175.8	198.6
		2204	134.9	186.8	208.8
		2205	127.6	176.5	196.7
		Mean	130.9	179.6	199.4
		S.D.	4.0	9.5	12.2

[부록 5] 수컷의 부검 소견

Animal No.	1101	Group : G1	Dose : 0	mg/kg	Terminal Sacrifice	: Day 14
Gross Findings :						
No abnormalities detected						
Animal No.	1102	Group : G1	Dose : 0	mg/kg	Terminal Sacrifice	: Day 14
Gross Findings :						
No abnormalities detected						
Animal No.	1103	Group : G1	Dose : 0	mg/kg	Terminal Sacrifice	: Day 14
Gross Findings :						
No abnormalities detected						
Animal No.	1104	Group : G1	Dose : 0	mg/kg	Terminal Sacrifice	: Day 14
Gross Findings :						
No abnormalities detected						
Animal No.	1105	Group : G1	Dose : 0	mg/kg	Terminal Sacrifice	: Day 14
Gross Findings :						
No abnormalities detected						
Animal No.	1201	Group : G2	Dose : 2,000	mg/kg	Terminal Sacrifice	: Day 14
Gross Findings :						
No abnormalities detected						
Animal No.	1202	Group : G2	Dose : 2,000	mg/kg	Terminal Sacrifice	: Day 14
Gross Findings :						
No abnormalities detected						
Animal No.	1203	Group : G2	Dose : 2,000	mg/kg	Terminal Sacrifice	: Day 14
Gross Findings :						
No abnormalities detected						
Animal No.	1204	Group : G2	Dose : 2,000	mg/kg	Terminal Sacrifice	: Day 14
Gross Findings :						
No abnormalities detected						
Animal No.	1205	Group : G2	Dose : 2,000	mg/kg	Terminal Sacrifice	: Day 14
Gross Findings :						
No abnormalities detected						

[부록 6] 암컷의 부검 소견

Animal No.	2101	Group :	G1	Dose :	0	mg/kg	Terminal Sacrifice	: Day 14
Gross Findings :								
No abnormalities detected								
Animal No.	2102	Group :	G1	Dose :	0	mg/kg	Terminal Sacrifice	: Day 14
Gross Findings :								
No abnormalities detected								
Animal No.	2103	Group :	G1	Dose :	0	mg/kg	Terminal Sacrifice	: Day 14
Gross Findings :								
No abnormalities detected								
Animal No.	2104	Group :	G1	Dose :	0	mg/kg	Terminal Sacrifice	: Day 14
Gross Findings :								
No abnormalities detected								
Animal No.	2105	Group :	G1	Dose :	0	mg/kg	Terminal Sacrifice	: Day 14
Gross Findings :								
No abnormalities detected								
Animal No.	2201	Group :	G2	Dose :	2,000	mg/kg	Terminal Sacrifice	: Day 14
Gross Findings :								
No abnormalities detected								
Animal No.	2202	Group :	G2	Dose :	2,000	mg/kg	Terminal Sacrifice	: Day 14
Gross Findings :								
No abnormalities detected								
Animal No.	2203	Group :	G2	Dose :	2,000	mg/kg	Terminal Sacrifice	: Day 14
Gross Findings :								
No abnormalities detected								
Animal No.	2204	Group :	G2	Dose :	2,000	mg/kg	Terminal Sacrifice	: Day 14
Gross Findings :								
No abnormalities detected								
Animal No.	2205	Group :	G2	Dose :	2,000	mg/kg	Terminal Sacrifice	: Day 14
Gross Findings :								
No abnormalities detected								

2. 세라마이드 나노전분 복합체의 미생물복귀돌연변이시험(AMES Test)

가. 재료 및 방법

(1) 시험물질 및 양성대조물질

- (가) 시험물질 : 세라마이드 나노전분 복합체
- (나) Vehicle (Negative control) : 멸균증류수

(2) 양성대조물질I (S9-)

- (가) 명 칭 : Sodium azide (NaN<sub>3</sub>)
- (나) CAS No.: 26628-22-8
- (다) 입수처 : Wako Pure Chem. Ind. Ltd (Japan)

- (라) Lot No.: DWL5550
- (마) 순 도 : 98 %
- (바) 보관조건 : 실온
- (사) 적 용 : TA1535 (0.5 µg/plate)

(3) 양성대조물질II (S9-)

- (가) 명 칭 : 9-aminoacridine (9-AA)
- (나) CAS No : 90-45-9
- (다) 입수처 : Sigma Chemical Co.
- (라) Lot No. : 106F06681
- (마) 순 도 : 98 %
- (바) 보관조건 : 실온
- (사) 적 용 : TA1537 (80 µg/plate)

(4) 양성대조물질III (S9-)

- (가) 명 칭 : 2-(2-furyl)-3-(5-nitro-2-furyl)acrylamide (AF-2)
- (나) CAS No : 3688-53-7
- (다) 입수처 : Wako Pure Chem. Ind. Ltd (Japan)
- (라) Lot No.: PAN0050
- (마) 순 도 : 98 %
- (바) 보관조건 : 실온
- (사) 적 용 : TA98 (0.1 µg/plate), TA100 (0.01 µg/plate) and E. coli WP2uvrA (0.01 µg/plate)

(5) 양성대조물질IV (S9+)

- (가) 명 칭 : 2-aminoanthracene (2-AA)
- (나) CAS No. : S34773-358
- (다) 입수처 : SigmAldrich, Inc.
- (라) Lot No. : S34773-358
- (마) 순 도 : 96 %
- (바) 보관조건 : 실온
- (사) 적 용 : TA98(0.5 µg/plate), TA100(1.0 µg/plate), TA1535(2.0µg/plate ), TA1537 (2.0 µg/plate) and E. coli WP2uvrA (10 µg/plate)

(6) 시험균주 및 배지

(가) 균주

시험에 사용한 균주는 OECD 가이드라인에 명기된 균주에서 선택하였고, 이 균주들은 미생물복귀돌연변이시험에서 널리 사용하고 있으며 기초 데이터가 풍부하기 때문에 선정하였다.

염기쌍치환형 : *Salmonella typhimurium* TA100, TA1535 and  
*Escherichia coli* WP2uvrA

Frame-shift 형 : *Salmonella typhimurium* TA98, TA1537

(나) 배지

시험균주들은 각각의 master plate로부터 15 mL의 전배양액 (2.5 % Oxoid nutrient broth NO.2)에 접종해 shaking incubator (37°C, 120rpm) 에서 약 10시간 배양하여 사용하였다. 최소배지 (minimal glucose agar plate) 는 1.5 % bacto agar (Difco) 와 Vogel-Bonner medium E 및 2% glucose를 함유한 것을 25 mL씩 분주하여 사용하였다. Top agar는 0.6% agar와 0.5 % NaCl로 조제하였으며, 살모넬라 균주용 top agar에는 0.5 mM histidine-biotin, 대장균용 균주에는 0.5 mM tryptophan을 100 mL당 10 mL씩 첨가하였다.

(7) 균주의 보관 및 형질 확인

(가) 균주의 보관

배양한 균배양액 0.8 mL당 Dimethyl Sulfoxide (DMSO) 0.07 mL을 가하여 냉동보관용 tube에 채워 dry ice에서 동결시킨 후 초저온 냉동고내에 보관하였으며, 형질이 확인된 균주의 master plate를 제작, 시험에 사용하였다.

(나) 균주의 형질확인

균주의 형질확인을 위해 *Salmonella typhimurium* 균주들의 경우 histidine 요구성 여부, uvrB mutation 유지 여부, R-factor 유지 여부, rfa mutation 유지 여부 및 spontaneous revertant의 수 등을 검사하였고, *Escherichia coli* WP2uvrA 균주에 있어서는 tryptophan 요구성 여부, uvrA mutation 유지 여부 및 spontaneous revertant의 수 등을 검사하였다.

(8) 대사활성계 (S9 Mix)

(가) S9

- 공급원 : Molecular Toxicologie Inc.(USA)
- 기 원 : Aroclor-1254로 유도한 수컷 Sprague-Dawley 랫드의 간
- Lot. No. : 2662, 2702
- 단백질함량 : 36.13, 37.4 mg/mL
- 보 관 : -80°C

(나) Cofactor

- 명 칭 : Cofactor-I
- 공급원 : Wako Pure Chem. Ind., Ltd. (Japan)

- 로트번호 : 999902
- 보관 : 냉장

(다) S9 Mix의 1 mL 중의 조성

- S-9 : 0.1 mL
- MgCl<sub>2</sub> : 8 μmol
- KCl : 33 μmol
- Glucose-6-phosphate : 5 μmol
- NADPH : 4 μmol
- NADH : 4 μmol
- Sodium phosphate buffer (pH 7.4) : 100 μmol

(9) 시험물질 및 양성대조물질의 조제

(가) 시험물질 조제

농도결정시험에서는 최고농도를 5000 μg/plate (50 mg/mL)로 하여 1000, 500, 100 및 50 μg/plate로 희석하여 5농도의 시험물질을 조제하였다. 본시험 및 확인 시험에서는 5000 μg/plate를 최고농도로 하여 공비 2의 단계 희석하여 5단계 농도의 시험물질을 조제하였다.

(나) 양성대조물질 조제

Sodium azide는 증류수에 용해하고, 다른 3개의 물질은 DMSO에 용해하여 냉장 보관한 후 시험 실시 시 해당하여 사용하였다.

(10) 시험방법

(가) 시험물질처리

시험물질의 처리는 pre-incubation 방법으로 하였다. 건열 멸균한 tube에 시험물질 현탁액 0.1 mL, S9 mix (또는 pH 7.4의 0.1 M sodium-phosphate buffer) 0.5 mL, 균배양액 0.1 mL을 넣고 37°C에서 20분간 진탕 (120rpm) 시킨 후 top agar를 2 mL씩 분주한 다음 혼합하고 즉시 minimal glucose agar plate에 부어 여러 방향으로 기울여 고루 퍼지게 하여 굳게 하였다. 음성 대조군은 시험물질 용액 대신 용매를, 양성 대조군은 시험물질 용액 대신 양성대조물질용액을 같은 방법으로 가하여 실시하였다. 플레이트가 굳으면 뒤집어서 37°C 배양기에 약 72시간 배양한 후 생성된 집락을 계수하였다. 시험물질 용액 및 S9 mix의 무균성 확인을 위해 시험물질 최고농도액 0.1 mL과 S9 mix 0.1 mL을 각각 2 mL의 top agar에 혼합하여 플레이트를 제작하였다.

(나) 농도결정시험

본시험의 최고농도를 결정하기 위해 0, 50, 100, 500, 1000 및 5000 μg/plate의 농도로 대사활성화법 적용 (S9+) 및 미적용 (S9-) 하에 5균주로 농도결정시험을 실시하였다.



군 당 3개의플레이트를 사용하였다.

(다) 본시험

농도결정시험의 시험결과에 따라 5000 µg/plate를 최고농도로 하고 공비 2의 5단계 농도군(312.5, 625, 1250, 2500 및 5000 µg/plate) 으로 하여 본시험을 실시하였다. 군 당 3개의 플레이트를 사용하였다.

(라) 확인시험

시험의 재현성을 확인하기 위하여 본시험과 같은 방법으로 시험을 실시하였다.

(11) 결과의 표시

시험결과는 군 당 3개의 플레이트로부터 얻은 집락 수의 평균±표준편차로 나타내었다.

(12) 결과 판정

대사활성계 적용 여부에 관계없이 최소 1개 균주에서 시험물질을 처리한 농도군의 집락 수가 음성 대조군과 비교하여 명확히 2배 이상 증가하면서, 용량의존성을 가지며, 그 작용에 재현성이 인정될 경우 양성으로 판정하였다.

나. 결과

조제한 시험물질 용액 및 에 대한 S9 Mix 무균시험결과, 미생물의 오염은 관찰되지 않았다. 농도결정시험결과, 시험물질에 대하여 5균주의 모든 농도에서 생육 저해는 확인되지 않았다(표 5). 이를 토대로 본시험의 최고농도를 5000 µg/plate로 선정하였으며, 312.5, 625, 1250, 2500 및 5000 µg/plate의 5단계 농도군과 음성 및 양성 대조군을 대사활성화법 적용(S9+) 및 미적용 (S9-)으로 본시험을 실시하였다. 본시험 결과, 모든 균주에 대해 시험물질을 처리한 농도군 모두에서 복귀돌연변이 집락 수는 음성대조군에 비해 증가 양상을 나타내지 않았다(표 6). 시험의 재현성을 확인하기 위해 본시험과 같은 방법으로 확인시험을 실시하였다. 확인시험 결과, 모든 균주에서 시험물질을 처리한 농도군 모두 음성 대조군에 비해 집락 수의 증가는 확인되지 않았다(표 7). 한편 모든 양성 대조군에서는 집락 수가 음성대조군에 비해 현저한 증가를 나타내었다(표 5~7 참조).

다. 고찰 및 결론

세라마이드 나노전분 복합체에 대한 미생물 복귀돌연변이 유발여부를 평가하기 위하여 *Salmonella typhimurium* 의 히스티딘 요구성 균주인 TA100, TA1535, TA98 및 TA1537의 4개의 균주와 *Escherichia coli*의 트립토판 요구성 균주인 WP2uvrA 를 이용하여 시험을 실시하였다. 시험물질은 멸균증류수에 용해하여 처리하였고, 5000 µg/plate를 최고농도로 하여 1000, 500, 100 및 50 µg/plate로 단계 희석하여 실시한 농도결정시험을 토대로 하여, 본시험에서는 대사활성화법 미적용 (S9-) 및 적용(S9+) 시 모두 5000, 2500, 1250, 625 및 312.5 µg/plate 농도로 음성 및 양성 대조군과 함께 시험을 실시하였

다. 시험결과, *Salmonella typhimurium* TA98, TA100, TA1535, TA1537과 *Escherichia coli* WP2uvrA의 5 균주에 대해 대사활성화법 미적용 (S9-) 및 (S9+) 적용 모두 음성대조군과 비교하여 각 농도별 시험물질 처리군에서의 집락 수는 증가 양상을 나타내지 않았다. 이상의 결과를 종합하여볼 때, 시험물질 세라마이드 나노전분 복합체는 본 시험 조건하에 사용한 균주들에 대하여 복귀돌연변이를 유발하지 않는 것(음성)으로 사료된다.

[표 5] 독성 농도 결정 실험 결과

Tester Strain	Chemical Treated	Dose (ug/plate)	Colonies/plate (Mean±S.D) [Factor] <sup>a)</sup>						
			Without S59 mix			With S9 mix			
TA98	Test Solution	0	23	±	5		37	±	8
		50	22	±	5	[ 1.0 ]	40	±	6 [ 1.1 ]
		100	28	±	6	[ 1.2 ]	41	±	9 [ 1.1 ]
		500	26	±	9	[ 1.1 ]	40	±	9 [ 1.1 ]
		1000	27	±	6	[ 1.2 ]	29	±	5 [ 0.8 ]
		5000	27	±	1	[ 1.2 ]	28	±	5 [ 0.8 ]
TA100	Test Solution	0	119	±	2		98	±	8
		50	116	±	6	[ 1.0 ]	100	±	9 [ 1.0 ]
		100	109	±	8	[ 0.9 ]	100	±	14 [ 1.0 ]
		500	104	±	10	[ 0.9 ]	107	±	13 [ 1.1 ]
		1000	101	±	6	[ 0.8 ]	105	±	10 [ 1.1 ]
		5000	109	±	14	[ 0.9 ]	105	±	5 [ 1.1 ]
TA1535	Test Solution	0	16	±	3		21	±	8
		50	15	±	3	[ 0.9 ]	24	±	5 [ 1.1 ]
		100	21	±	1	[ 1.3 ]	24	±	3 [ 1.1 ]
		500	19	±	2	[ 1.2 ]	25	±	3 [ 1.2 ]
		1000	16	±	2	[ 1.0 ]	25	±	2 [ 1.2 ]
		5000	19	±	2	[ 1.2 ]	22	±	7 [ 1.0 ]
TA1537	Test Solution	0	13	±	2		20	±	4
		50	11	±	1	[ 0.9 ]	15	±	3 [ 0.8 ]
		100	11	±	2	[ 0.9 ]	23	±	2 [ 1.2 ]
		500	14	±	7	[ 1.1 ]	26	±	6 [ 1.3 ]
		1000	12	±	2	[ 0.9 ]	17	±	6 [ 0.8 ]
		5000	11	±	1	[ 0.8 ]	11	±	1 [ 0.6 ]
WP2uvrA	Test Solution	0	38	±	11		60	±	7
		50	36	±	4	[ 0.9 ]	63	±	12 [ 1.1 ]
		100	40	±	15	[ 1.1 ]	68	±	6 [ 1.1 ]
		500	33	±	3	[ 0.9 ]	71	±	5 [ 1.2 ]
		1000	28	±	7	[ 0.7 ]	75	±	7 [ 1.3 ]
		5000	26	±	2	[ 1.0 ]	69	±	9 [ 1.2 ]
Positive controls									
TA98	AF-2	0.1	320	±	9	[ 13.9 ]			
TA100	AF-2	0.01	456	±	43	[ 3.8 ]			
TA1535	NaN <sub>3</sub>	0.5	206	±	21	[ 12.9 ]			
TA1537	9-AA	80.0	747	±	6	[ 56.0 ]			
WP2uvrA	AF-2	0.01	326	±	28	[ 8.7 ]			
TA98	2-AA	0.5					346	± 19 [ 9.3 ]	
TA100	2-AA	1.0					375	± 55 [ 10.1 ]	
TA1535	2-AA	2.0					196	± 16 [ 9.5 ]	
TA1537	2-AA	2.0					214	± 20 [ 10.7 ]	
WP2uvrA	2-AA	10.0					224	± 22 [ 3.8 ]	

a) No. of colonies of treated plate/No. of colonies of negative control plate  
 NaN<sub>3</sub> : Sodium azide, AF-2 : 2-(2-furyl)-3-(3-intro-2-furyl)acrylamide  
 9-AA: 9-Aminoacridine, 2-AA : 2-Aminoanthracene

[표 6] 복귀돌연변이 집락수 결과

Tester Strain	Chemical Treated	Dose (ug/plate)	Colonies/plate (Mean±S.D) [Factor] <sup>a)</sup>						
			Without S9 mix			With S9 mix			
TA98	Test Solution	0	19	±	5		36	±	7
		312.5	13	±	2	[ 0.7 ]	32	±	4 [ 0.9 ]
		625	16	±	2	[ 0.9 ]	32	±	4 [ 0.9 ]
		1250	19	±	4	[ 1.0 ]	32	±	3 [ 0.9 ]
		2500	17	±	2	[ 0.9 ]	25	±	5 [ 0.7 ]
		5000	19	±	5	[ 1.0 ]	30	±	2 [ 0.8 ]
TA100	Test Solution	0	150	±	16		164	±	7
		312.5	146	±	20	[ 1.0 ]	144	±	21 [ 0.9 ]
		625	137	±	10	[ 0.9 ]	146	±	9 [ 0.9 ]
		1250	147	±	5	[ 1.0 ]	138	±	13 [ 0.8 ]
		2500	143	±	7	[ 1.0 ]	143	±	20 [ 0.9 ]
		5000	146	±	20	[ 1.0 ]	153	±	12 [ 0.9 ]
TA1535	Test Solution	0	17	±	5		17	±	1
		312.5	16	±	4	[ 1.0 ]	12	±	1 [ 0.7 ]
		625	18	±	3	[ 1.1 ]	15	±	1 [ 0.9 ]
		1250	14	±	1	[ 0.8 ]	16	±	5 [ 0.9 ]
		2500	15	±	6	[ 0.9 ]	18	±	5 [ 1.0 ]
		5000	15	±	6	[ 0.9 ]	15	±	1 [ 0.8 ]
TA1537	Test Solution	0	9	±	3		22	±	3
		312.5	8	±	2	[ 0.9 ]	15	±	3 [ 0.7 ]
		625	12	±	1	[ 1.3 ]	18	±	1 [ 0.8 ]
		1250	11	±	3	[ 1.2 ]	21	±	8 [ 0.9 ]
		2500	10	±	2	[ 1.0 ]	21	±	2 [ 1.0 ]
		5000	10	±	2	[ 1.0 ]	15	±	4 [ 0.7 ]
WP2 <u>uvrA</u>	Test Solution	0	49	±	5		40	±	7
		312.5	41	±	3	[ 0.8 ]	41	±	11 [ 1.0 ]
		625	47	±	13	[ 1.0 ]	39	±	2 [ 1.0 ]
		1250	39	±	6	[ 0.8 ]	42	±	2 [ 1.0 ]
		2500	44	±	3	[ 0.9 ]	46	±	3 [ 1.1 ]
		5000	39	±	5	[ 0.8 ]	46	±	2 [ 1.1 ]
Positive controls									
TA98	AF-2	0.1	519	±	12	[ 27.8 ]			
TA100	AF-2	0.01	436	±	46	[ 2.9 ]			
TA1535	NaN <sub>3</sub>	0.5	222	±	17	[ 13.3 ]			
TA1537	9-AA	80.0	771	±	28	[ 82.6 ]			
WP2 <u>uvrA</u>	AF-2	0.01	212	±	12	[ 4.3 ]			
TA98	2-AA	0.5					351	±	43 [ 9.7 ]
TA100	2-AA	1.0					352	±	16 [ 9.7 ]
TA1535	2-AA	2.0					222	±	6 [ 12.8 ]
TA1537	2-AA	2.0					198	±	11 [ 9.0 ]
WP2 <u>uvrA</u>	2-AA	10.0					250	±	13.1 [ 6.2 ]

a) No. of colonies of treated plate/No. of colonies of negative control plate  
 NaN<sub>3</sub> : Sodium azide, AF-2 : 2-(2-furyl)-3-(3-intro-2-furyl)acrylamide  
 9-AA: 9-Aminoacridine, 2-AA : 2-Aminoanthracene

[표 7] 재현성 확인 실험 결과

Tester Strain	Chemical Treated	Dose (ug/plate)	Colonies/plate (Mean±S.D) [Factor] <sup>a)</sup>						
			Without S9 mix			With S9 mix			
TA98	Test Solution	0	15	±	3		20	±	4
		312.5	13	±	4	[ 0.9 ]	14	±	3 [ 0.7 ]
		625	18	±	3	[ 1.2 ]	14	±	4 [ 0.7 ]
		1250	16	±	5	[ 1.1 ]	14	±	3 [ 0.7 ]
		2500	12	±	4	[ 0.8 ]	16	±	2 [ 0.8 ]
		5000	12	±	3	[ 0.8 ]	15	±	5 [ 0.8 ]
TA100	Test Solution	0	66	±	10		66	±	7
		312.5	71	±	6	[ 1.1 ]	62	±	15 [ 0.9 ]
		625	71	±	5	[ 1.1 ]	71	±	9 [ 1.1 ]
		1250	67	±	4	[ 1.0 ]	68	±	2 [ 1.0 ]
		2500	73	±	4	[ 1.1 ]	64	±	4 [ 1.0 ]
		5000	68	±	12	[ 1.0 ]	71	±	8 [ 1.1 ]
TA1535	Test Solution	0	9	±	3		10	±	2
		312.5	10	±	3	[ 1.1 ]	8	±	2 [ 0.8 ]
		625	10	±	2	[ 1.1 ]	10	±	4 [ 0.9 ]
		1250	12	±	2	[ 1.3 ]	8	±	2 [ 0.7 ]
		2500	9	±	1	[ 0.9 ]	9	±	2 [ 0.8 ]
		5000	10	±	4	[ 1.0 ]	10	±	5 [ 1.0 ]
TA1537	Test Solution	0	7	±	1		5	±	2
		312.5	8	±	1	[ 1.1 ]	5	±	1 [ 0.9 ]
		625	8	±	1	[ 1.0 ]	5	±	2 [ 1.0 ]
		1250	7	±	2	[ 1.0 ]	5	±	1 [ 1.0 ]
		2500	6	±	3	[ 0.8 ]	7	±	1 [ 1.3 ]
		5000	6	±	2	[ 0.9 ]	7	±	3 [ 1.3 ]
WP2 <i>uvrA</i>	Test Solution	0	32	±	1		35	±	2
		312.5	32	±	2	[ 1.0 ]	34	±	5 [ 1.0 ]
		625	32	±	3	[ 1.0 ]	32	±	4 [ 0.9 ]
		1250	39	±	5	[ 1.2 ]	31	±	4 [ 0.9 ]
		2500	31	±	5	[ 1.0 ]	37	±	5 [ 1.0 ]
		5000	38	±	3	[ 1.2 ]	40	±	9 [ 1.1 ]
Positive controls									
TA98	AF-2	0.1	331	±	14	[ 22.0 ]			
TA100	AF-2	0.01	355	±	6	[ 5.4 ]			
TA1535	NaN <sub>3</sub>	0.5	224	±	9	[ 24.0 ]			
TA1537	9-AA	80.0	755	±	14	[ 102.9 ]			
WP2 <i>uvrA</i>	AF-2	0.01	204	±	12	[ 6.4 ]			
TA98	2-AA	0.5					232	± 9 [ 11.6 ]	
TA100	2-AA	1.0					304	± 7 [ 15.2 ]	
TA1535	2-AA	2.0					238	± 26 [ 23.0 ]	
TA1537	2-AA	2.0					194	± 6 [ 36.4 ]	
WP2 <i>uvrA</i>	2-AA	10.0					243	± 24.9 [ 6.9 ]	

<sup>a)</sup> No. of colonies of treated plate/No. of colonies of negative control plate  
 NaN<sub>3</sub> : Sodium azide, AF-2 : 2-(2-furyl)-3-(3-intro-2-furyl)acrylamide  
 9-AA: 9-Aminoacridine, 2-AA : 2-Aminoanthracene

## 5절. 나노 전분 복합체의 안정성 평가

### 1. 세라미이드 나노전분 복합체 분말의 저장안정성 평가

#### 가. 재료 및 방법

##### (1) 시료

본 연구에서 사용한 세라미이드 나노전분 복합체는 제 1협동(고려대)에 의해 제조된 복합체를 사용 하였으며, 건조된 분말 복합체를 알루미늄 파우치에 5 mg씩 분주하여 상온에 보관 하면서 실험에 사용하였다.

##### (2) 실험 방법

###### (가) 입도 및 표면전하

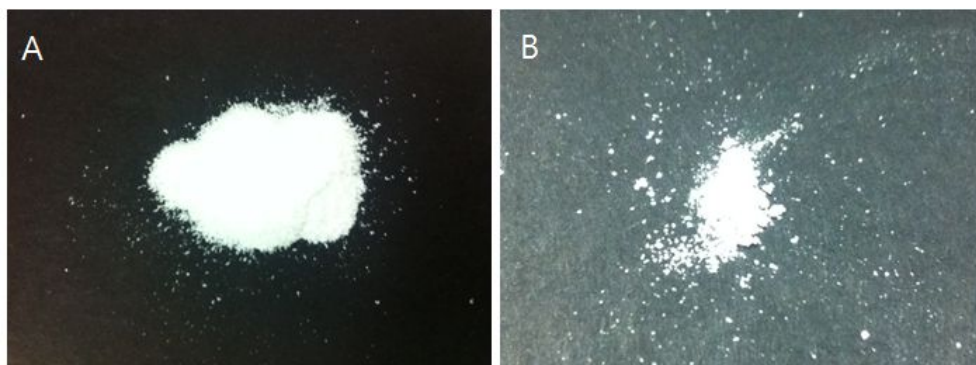
복합체의 입도 및 표면전하는 Zetasizer Nano ZS (Zen 3600, Malvern, U.S.A)로 측정하였다. 상온에 보관한 세라미이드 나노전분 복합체를 2 mg취하여 증류수 20 mL에 분산시킨 후, ultrasonication (750W/cm<sup>2</sup>, 80% amplitude, VCX130, Uibracell Sonics & materials, USA)를 이용하여 0, 1, 3, 5분 처리한 후 1 mL를 증류수 9 mL에 분산시켜 균질화 한 후, 1 mL를 취하여 전용 cell에 담아 측정하였다.

###### (나) 색도

색도는 색차계(CR-10, Minolta Co., Japan)를 이용하여 명도(L, lightness), 적색도(a, redness), 황색도(b, yellowness)를 반복 측정하여 평균값으로 나타내었다.

#### 나. 연구 결과

분말의 나노 전분 복합체의 사진은 그림 1과 같으며, 저장하기 전의 복합체는 미세한 입자로서 작은 바람에도 흩날리는 모습이었지만, 알루미늄 파우치에 저장한 후 복합체의 모습은 포장재 내에서의 압착의 영향으로 입자가 엉겨 있는 것을 확인 할 수 있다.

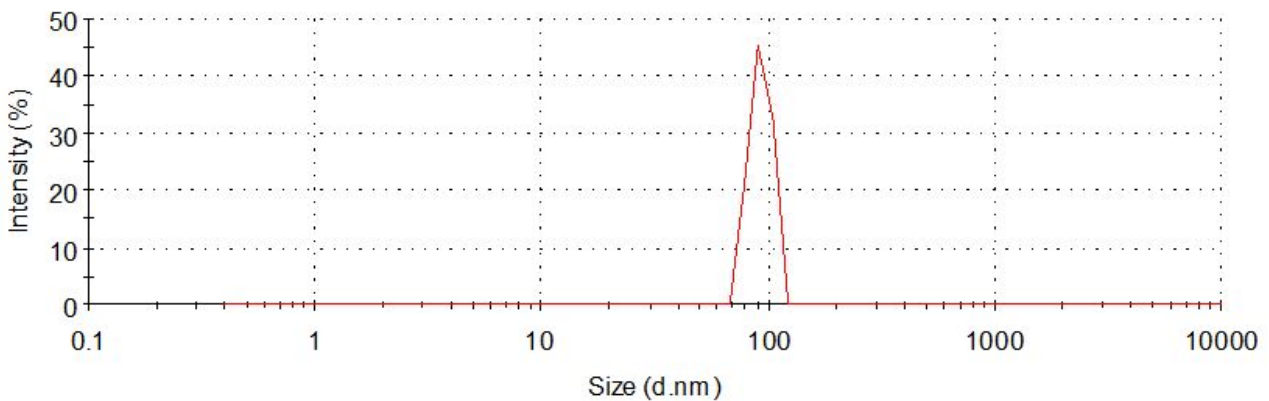


[그림 1] 세라미이드-덱스트린 복합체 분말

A; stored for 0 day. B; stored for 7 day in aluminum pouch

(1) 입도측정

분말의 전분 복합체의 입도분포는 초음파 분쇄기 처리시간에 따른 변화와 저장 기간에 따른 변화로 나타내었다. 전분 복합체의 입도는 액상의 경우 100 nm 부근에서의 복합체형성 peak를 확인 할 수 있었으나, 분말 복합체의 경우는 액상 복합체보다 aggregation 현상이 더 많이 진행된 상태 이므로 초기 100 nm 부근의 복합체형성 peak는 확인 할 수 없었다. 이것은 건조과정과 aggregation에 따른 입도 size 증가로 인한 것이라 생각되며 앞으로 개선·보완되어야 할 문제점이라 사료된다.



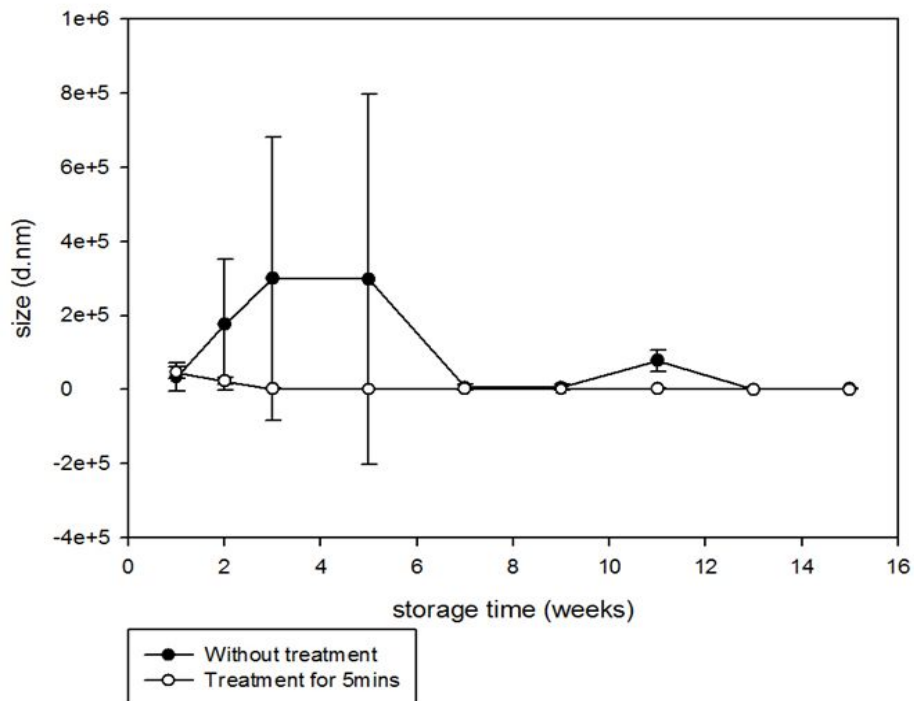
[그림 2] 세라마이드-덱스트린 복합체 분말의 입도 분포도

15주 동안 세라마이드-덱스트린 복합체를 알루미늄파우치에 저장하면서 그에 따른 입도 변화를 관찰하였다. 분말의 경우 위의 그림 1에서 보는바와 같이 시간이 지남에 따라 케이킹 현상을 나타냈으며, 샘플의 채취 부위에 따라 입도의 사이즈가 크게 달라졌다. 따라서, 표 1과 그림 3에서의 저장기간에 따른 입도 차이는 의미가 없다고 사료되며 저장기간에 따른 큰 변화는 없었다. 한편 aggregation 되어진 입자들은 비교적 짧은 시간의 초음파 분쇄기 처리 (5분간)에 의해 고르게 분산되는 것을 관찰할 수 있었다. 이는 복합체의 입도크기 및 입자간의 편차가 줄어든 결과를 통해 확인할 수 있었다. 따라서 복합체의 입도 크기 균일화 및 입자크기의 감소는 초음파 분쇄기 같은 물리적 처리를 통해 가능하다고 사료된다.

[표 8] 저장 기간에 따라 초음파 분쇄기 5분 처리에 따른 세라마이드-덱스트린 복합체의 입자 크기 변화

(d.nm)

Storage time (weeks)	Ultrasonication time (min)	
	0	5
1	32191.89 ± 38695.04	46240 ± 16197.14
2	175500 ± 175799.3	23152.11 ± 8546.29
3	299623 ± 382557.4	1634.2 ± 1634.2
5	298244 ± 498757.6	805.95 ± 119.67
7	6217.78 ± 7803.79	1804.56 ± 558.19
9	5866.67 ± 7425.19	755.7 ± 104.28
11	77848.33 ± 29242.39	1665.62 ± 1001.56
13	1277.49 ± 104.18	317.76 ± 77.95
15	1469.37 ± 1326.83	489.03 ± 11.88



[그림 3] 저장기간에 따라 초음파 분쇄기 5분 처리에 따른 세라마이드-덱스트린 복합체의 입자 크기 변화

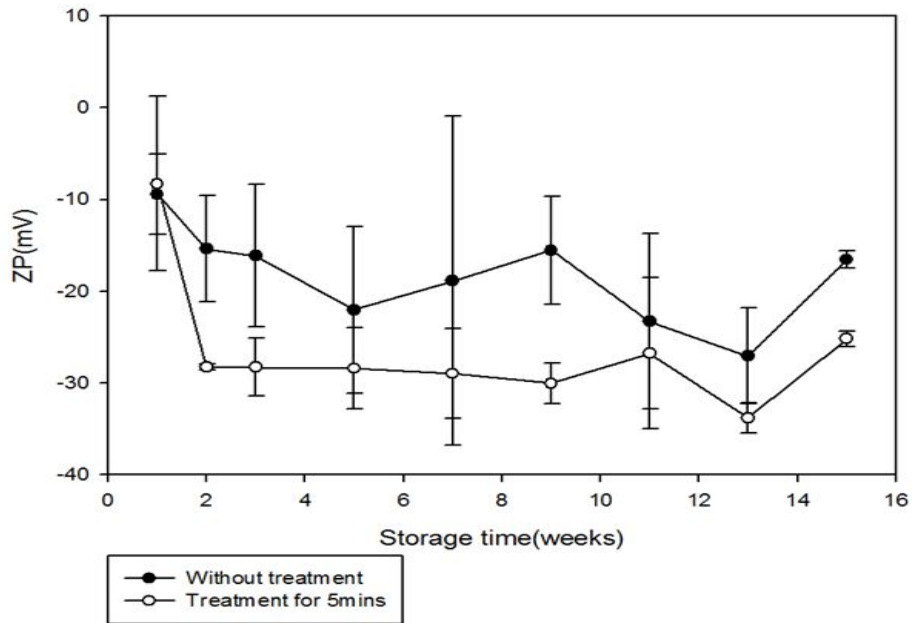
(2) 표면전하 측정

저장기간과 초음파 분쇄기 처리에 따른 표면전하의 변화양상은 표 9와 그림 4에 제시하였다. 표면전하 (Zeta potential)는 가까이 있는 입자들 사이의 반발력을 의미하며 이 값은 분산안정성과 관련이 있다. 입자의 크기가 작은 경우 30 mV (음 또는 양의 값) 이상의 표면전하 값은 분산액의 안정성을 의미하며 응집(aggregation)에 대한 저항성을 제공한다고 보고되고 있다 (ASTM, 1985). 저장기간에 따른 표면전하 비교 시, 1주차 보다 2주차 이상 저장 시 표면전하 값이 더 커지는 것을 확인 할 수 있으며, 단지 샘플링에 따른 경향으로 볼 수 있는지는 실험이 더 진행된 후 판단해야 되는 것으로 사료된다. 한편 초음파 분쇄기 처리에 따라 표면전하 값이 커지는 것으로 보아 (1주차는 제외) 초음파 분쇄기 처리를 통해 복합체의 안정성을 증가됨을 확인할 수 있었다.

[표 9] 저장기간에 따라 초음파 분쇄기 5분 처리에 따른 세라마이드-텍스트린 복합체의 표면전하 변화

Storage time (week)	Ultrasonication time (min)	
	0	5
1	-9.42 ± 4.40	-8.30 ± 9.51
2	-15.39 ± 5.80	-28.27 ± 0.32
3	-16.14 ± 7.78	-28.27 ± 3.19
5	-22.05 ± 9.05	-28.41 ± 4.44
7	-18.86 ± 17.91	-28.98 ± 4.91
9	-15.54 ± 5.86	-30.03 ± 2.188
11	-23.27 ± 9.53	-26.76 ± 8.25
13	-27.06 ± 5.25	-33.8 ± 1.62
15	-16.55 ± 0.97	-25.17 ± 0.85





[그림 4] 저장기간에 따라 초음파 분쇄기 5분 처리에 따른 세라미이드-텍스트린 복합체의 표면전하 변화

### (3) 색도 측정

분말의 나노전분 복합체의 색도측정 결과는 표 10에서 보는 바와 같다. 색도 값은 10회 반복측정 후 평균값으로 나타내었는데 15주 저장기간 동안 색도의 변화는 나타나지 않았다. 이것은 알루미늄 파우치에 포장되어 있기 때문에 빛이나 공기에 의한 산화현상이 일어나지 않은 것으로 판단된다.

[표 10] 세라미이드-텍스트린 복합체의 색도 변화

Storage time (weeks)	L	-a	+b
1	92.6 ± 0.2	0.5 ± 0.6	8.6 ± 0.2
2	92.8 ± 0.1	0.3 ± 0.4	8.8 ± 0.1
3	93.0 ± 0.3	0.1 ± 0.0	9.1 ± 0.1
5	92.3 ± 0.1	0.1 ± 0.1	8.6 ± 0.1
7	92.9 ± 0.1	0.5 ± 0.0	9.7 ± 0.0
9	92.5 ± 0.2	0.5 ± 0.0	9.1 ± 0.0
11	92.0 ± 0.1	0.4 ± 0.0	9.1 ± 0.0
13	91.4 ± 0.1	1.5 ± 0.0	6.4 ± 0.1
15	91.3 ± 0.4	1.5 ± 0.0	7.1 ± 0.2

## 2. 세라마이드 나노전분 복합체 액상의 저장안정성 평가

### 가. 재료 및 방법

#### (1) 시료

본 연구에서 사용한 나노 전분 복합체는 제 1협동(고려대)에 의해 제조된 복합체를 사용 하였으며, 멸균한 갈색 바이알에 4 mL씩 분주하여 4°C와 상온에 보관하였다.

#### (2) 실험 방법

##### (가) 미생물

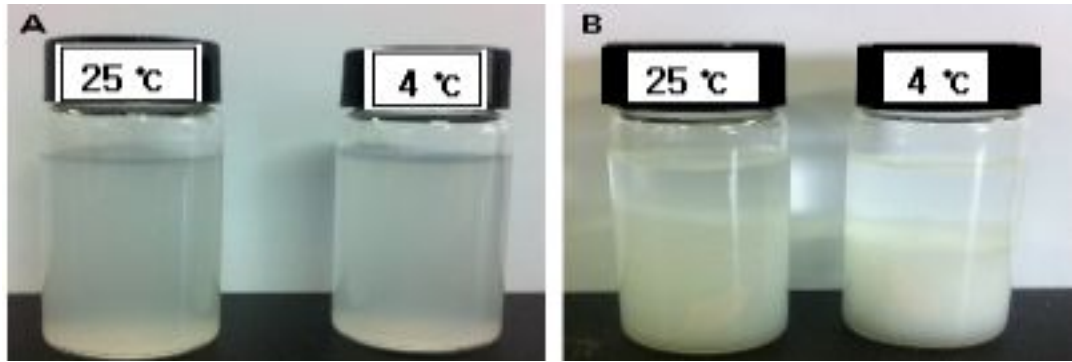
각각 4°C와 상온에 보관한 샘플 1 mL을 멸균수 9 mL에 가한 다음 균질화 한 후  $10^{-3}$  까지 희석하여 시험에 사용하였다. 일반세균은 nutrient broth(Difco Labs., Becton, Dickinson and Company, USA)에 0.1% agar(Bacto Labs., Becton, Dickinson and Company, USA)를 첨가하여 원액에서  $10^{-3}$  희석액을 petri dish에 1 mL 분주하여 37°C에서 48시간 배양하였고, 효모 및 곰팡이균은 potato dextrose agar(Difco Labs., Becton, Dickinson and Company, USA)를 사용하여 25°C에서 3~5일 배양하여 생성된 colony의 수를 육안으로 계수하여 시료 1 mL당 colony forming unit(CFU/mL)로 나타 내었다.

##### (나) 입도 및 표면전하

복합체의 입도 및 표면전하는 Zetasizer Nano ZS (Zen 3600, Malvern, U.S.A)로 측정하였다. 상온에 보관한 복합체를 1 mL 취하여 증류수 19 mL에 분산시킨 후, ultrasonication (750W/cm<sup>2</sup>, 80% amplitude, VCX130, Uibracell Sonics & materials, USA)를 이용하여 0분, 1분, 3분, 5분 처리한 후 1 mL를 증류수 9 mL에 분산시켜 균질화 한 후, 1 mL를 취하여 전용 cell에 담아 측정하였다.

### 나. 연구 결과

액상형태의 세라마이드 나노전분 복합체는 그림 5에서 보이는 바와 같이 투명한 바이알에 담아 알루미늄 호일로 감싼 다음 저장하였으며, 분석할 샘플의 경우에는 갈색 바이알에 분주하여 보관하였다. 7일간 저장한 복합체의 경우 온도여부와 관계없이 침전물이 생기는 것을 관찰할 수 있었고, 특히 4°C의 경우 두드러졌다. 이는 전분의 경우 4°C에서 노화가 가장 빠르게 진행되기 때문에 일어난 현상으로 사료된다.



[그림 5] 저장기간에 따른 세라마이드-덱스트린 복합체 용액의 형상  
(A: 0 day, B: 7 days storage)

(1) 미생물에 대한 안정성 평가

액상의 세라마이드 나노전분 복합체의 미생물실험 결과는 표 11와 같으며, 98일의 저장기간 동안 일반세균, 효모 및 곰팡이가 관찰되는지 확인하였다.

[표 11] 4, 25°C에 저장된 세라마이드-덱스트린 복합체 용액의 미생물 성장 변화  
(CFU/mL)

		0	1	3	7	14	21	28	35	42	49	56	63	70	77	84	91	98
일반 세균	4°C	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	25°C	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
효모 및 곰팡이	4°C	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	25°C	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

상기 표 4에서 보는바와 같이 1차년도에 이어 진행된 세라마이드 나노전분 복합체의 미생물실험은 98일까지 안정하다고 판단된다. 이것은 전분호화액을 멸균시킨 후 복합체를 제조하였기 때문에 그 후에 낙하균과 같은 미생물에 대한 오염의 기회가 적기 때문인 것으로 사료된다. 따라서 약 100일의 저장기간이 지나도 복합체 액상샘플에서는 균체가 발견되지 않았다. 따라서, 나노전분 복합체는 3개월간 미생물적으로 안정하다는 것을 의미한다.

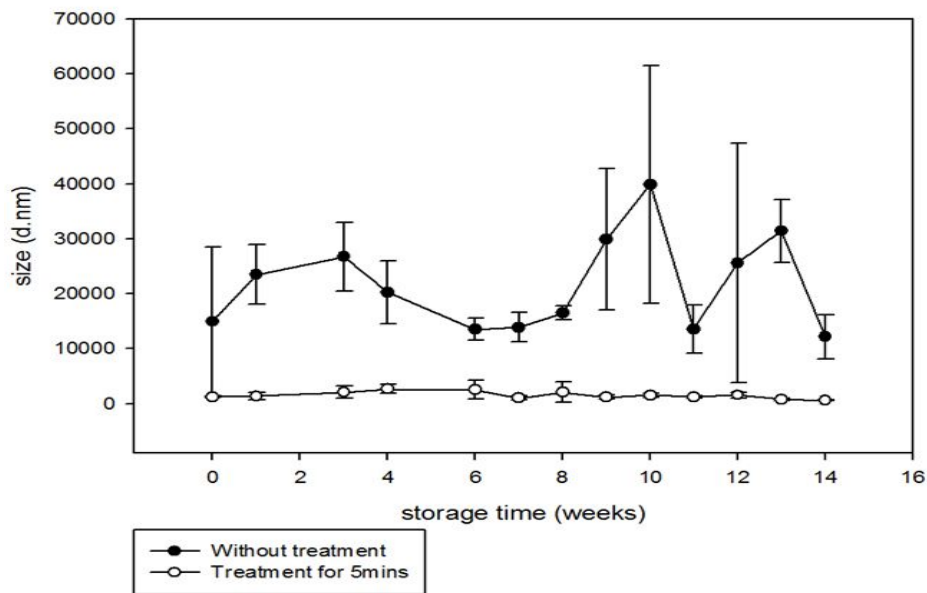
(2) 입도측정

액상의 세라마이드 나노전분 복합체의 저장기간에 따른 입도분포 변화 또한 관찰하였다. 14주 저장기간에 따른 액상 전분복합체의 입도분포는 일정하게 증가하지도 감소하지도 않는 불균일한 형태였다. 이는 저장기간에 따른 복합체 입자들끼리의 aggregation으로 나타난 결과라고 사료된다. 한편, ultrasonication 처리 후 입도 사이즈가 감소하는 것을 확인

할 수 있었다. 이와 더불어 저장기간에 따라 다양하게 나타났던 입도분포가 비교적 균일한 형태로 개선되는 것을 확인할 수 있었다.

[표 12] 5분 동안 초음파 분쇄기 처리에 따른 세라마이드-텍스트린 복합체 용액의 입자 분포 변화 (d.nm)

Storage time (week)	Ultrasonication time (min)	
	0	5
0	14983 ± 13596.7	1267.5 ± 90.77
1	23488.9 ± 5414.54	1400.02 ± 630.94
2	29961. ± 20025.4	7804.67 ± 11099.1
3	26787.8 ± 6246.73	2105.11 ± 1057.38
4	20258.9 ± 5730.9	2691.89 ± 873.63
5	3912.2 ± 26612.1	8466.78 ± 6495.7
6	13542.4 ± 1970.56	2569.01 ± 1703.71
7	13897.1 ± 2667.84	1058.71 ± 326.82
8	16548.9 ± 1306.96	2119.22 ± 1811.16
9	29971.1 ± 12879.3	1218.38 ± 320.52
10	39926.7 ± 21594.9	1551.01 ± 381.16
11	13584.2 ± 4419.95	1272.77 ± 226.31
12	25608.9 ± 21766.7	1578.21 ± 526.53
13	31474.4 ± 5718.41	788.92 ± 172.62
14	12191.8 ± 3998.07	575.43 ± 79.48



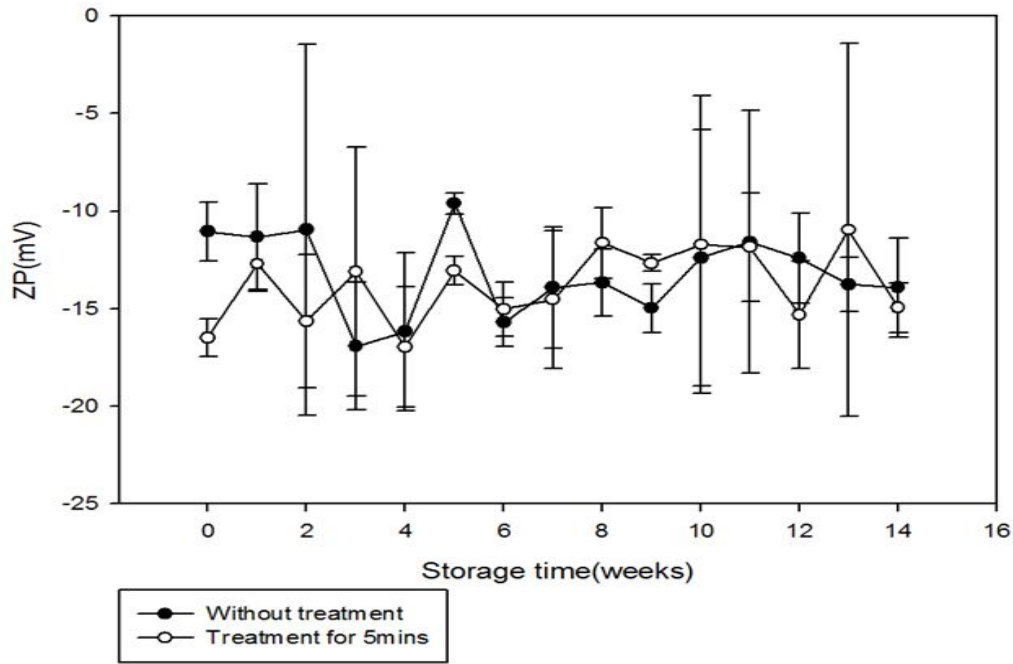
[그림 6] 5분 동안 초음파 분쇄기 처리에 따른 세라마이드-텍스트린 복합체 용액의 입자 분포 변화

(3) 표면전하 측정

액상 전분복합체의 저장기간에 따른 표면전하의 변화양상은 표 13과 그림 7에 나타내었다. 상기 그림 6에서 확인되었듯이, 저장기간에 따라 복합체 입자들끼리의 aggregation 현상으로 인해 입도가 커지기 때문에 그 영향으로 표면전하에 미친다. 그 결과로 분산성이 약해지기 때문에 표면전하는 표준편차가 굉장히 크고 그에 따른 표면전하의 경향이 나타나지 않았다. 또한 초음파 분쇄기를 처리한 경우는 처리하지 않은 경우보다 표준편차를 줄일 수 있으나, 그 역시도 저장기간에 따른 큰 변화를 나타내지 않았다. 따라서 초음파 분쇄기 처리를 할 경우 그에 따른 균일성을 줄일 수는 있으나, 분산성에는 큰 영향을 미치지 않으며, 액상 나노전분 복합체는 저장 경과 1주부터 분산성에 큰 차이가 나타나는 것으로 사료된다.

[표 13] 5분 동안 초음파 분쇄기 처리에 의해 저장된 세라마이드-텍스트린 복합체 용액의 입자 크기 변화 (mV)

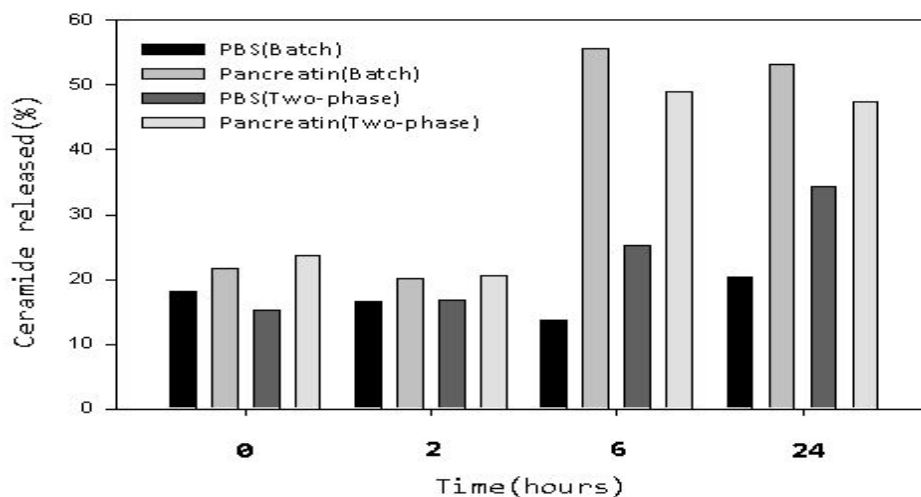
Storage time (week)	Ultrasonication time (min)	
	0	5
0	-11.06 ± 1.49	-20.72 ± 1.28
1	-11.32 ± 2.72	-8.87 ± 2.63
2	-10.94 ± 9.51	-18.88 ± 4.38
3	-16.92 ± 3.26	-6.33 ± 8.60
4	-16.18 ± 4.05	-13.97 ± 1.51
5	-9.61 ± 0.55	-13.22 ± 0.88
6	-15.7 ± 1.24	-16.98 ± 2.04
7	-13.92 ± 3.12	-14.72 ± 0.46
8	-13.67 ± 1.87	-20.3 ± 1.37
9	-14.97 ± 1.24	-16.01 ± 3.74
10	-12.39 ± 6.58	-12.89 ± 7.83
11	-11.58 ± 6.71	-10.96 ± 1.32
12	-12.41 ± 2.29	-15.31 ± 2.75
13	-13.76 ± 1.38	-10.97 ± 9.57
14	-13.91 ± 2.55	-14.94 ± 1.27



[그림 7] 5분 동안 초음파 분쇄기 처리에 의해 저장된 세라미이드-덱스트린 복합체 용액의 입자 크기 변화

## 6절 나노 전분 복합체의 생체이용률 평가

### 1. 세라미이드 나노전분 복합체의 *In vitro* 소화율 방출 패턴



[그림 1] 두가지 다른 방식(Batch and Two-phase system)에서 형성된 복합체의 소화 효소 방출 특성

- V-amylose complex는  $\alpha$ -amylase에 의해 digestion될 수 있고 따라서 polysaccharide helical structure 안에 포접된 bioactive compound를 방출할 수 있다. 이러한 구조는 guest compound를 소장까지 화학적으로 안정한 형태로 운반할 수 있으며,  $\alpha$ -amylase가

분비될 때 소장에서 방출될 수 있는 장점이 있다(R. Cohen et al., 2011).

- 복합체로부터 세라마이드의 방출패턴은 24시간동안 pancreatin digestion에 의해 테스트되었다.
- Pancreatic solution에서의 세라마이드 방출은 PBS에서 보다 훨씬 높았음(Batch system 과 Two-phase system 모두에서)
- 한편, 최대치는 6시간에 도달하였다. 이러한 시간은 소장을 통한 식품의 정상적인 운반시간과 일치한다.

## 2. 세라마이드 나노전분 복합체의 혈액(Serum)에서의 세라마이드 흡수율(*In vivo*)

### 가. 세라마이드 함량 측정 및 분석방법 확립

#### (1) 혈액 전처리

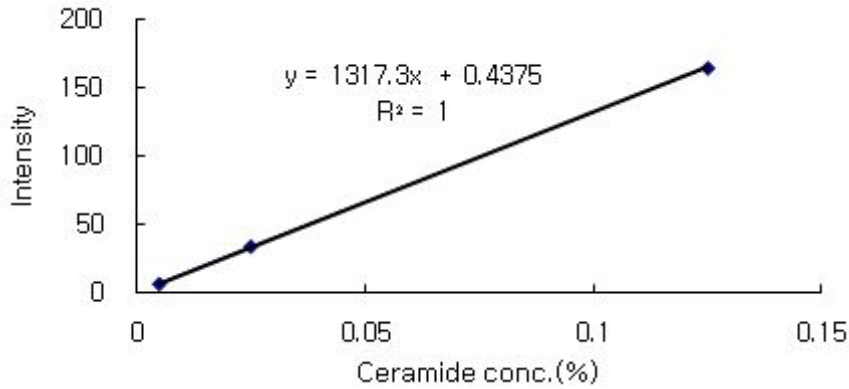
Serum 50  $\mu$ L를 chloroform/Methanol(1:2) 용매 2 mL에 희석한 뒤 지방질을 추출한다. 이후, chloroform 0.5 mL과 water 0.5 mL을 첨가 하고 원심분리(1000rpm, 10min)한 후 유기층을 취한다. 유기층을 취하고 남은 용액에 다시 한 번 chloroform 1 mL를 첨가해주고, 유기층은 질소를 이용하여 제거한 후, 남은 잔여물을 1시간동안 50°C에서 isopropylalcho 2 mL에 재분산 시킨다.

#### (2) Standard

표준품(DS-DERAMIDE-Y30)를 isopropyl alcohol에 1%(w/v) 농도로 희석한다. 희석된 용액을 적정농도로 희석하여 standard curve를 작성한다.

#### (3) 분석조건

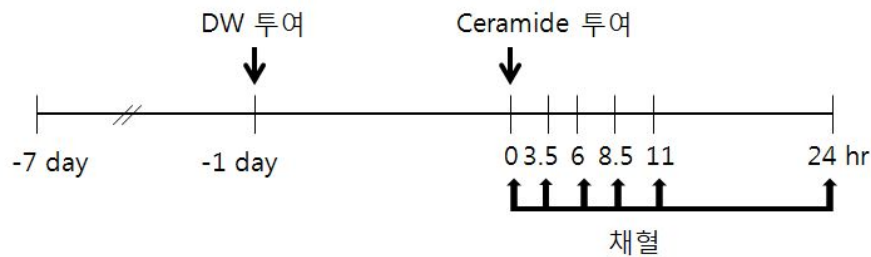
Column	TSK gel silica-60 (Tosoh Bioscience, Montgomeryville, PA, USA)
Detector	Refractive index (Shodex RI-71, Tokyo, Japan)
Injection volume	100 $\mu$ L
Mobile phase	Isopropyl : Water = 7 : 3
flow rate	0.4mL/min



[그림 2] 세라마이드 검량 곡선

나. SD rat에 대한 세라마이드와 세라마이드 나노전분복합체의 생체이용성 비교

(1) *in vivo* 실험디자인



(2) 재료 및 방법 (Materials & Methods)

(가) 시험물질 및 대조물질

- ① 시험물질 : 세라마이드 나노전분복합체(고려대)
- ② 대조물질 : 세라마이드 (DS-CERAMIDE-Y30, DUSAN, KOREA)

(나) 시험물질 조제

시험물질은 복합체 형성 방법을 통해 고려대에서 조제한 시료를 사용하였고, 대조물질은 텍스트린과 세라마이드(DS-CERAMIDE-Y30, DUSAN, KOREA)을 물리적으로 혼합하여 복합체와 동일한 농도로 조제하였다.

(다) 시험계

- ① 동물종 : Male Spraque-Dawley rat
- ② 공급원 : 대한바이오링크(충청북도 음성군 삼성면 대야리 113)
- ③ 투여 시 주령 및 체중범위 : 7~8주령, 200~249g
- ④ 순화 및 검역

동물을 구입하여 7일 동안 동물사육실의 환경에서 검역 및 순화시키면서 일반적인 건



강상태를 관찰한 후 건강한 개체를 선별하여 실험에 사용하였다. 투여 2일 전에 멸균증류수를 이용하여 경구투여 적응훈련을 실시하였다.

#### (라) 사육환경

##### ① 환경

본 실험의 환경은 온도 20.9~22.5℃, 상대습도 49.5~50.8%, 환기 횟수 10~15회/hr, 조명시간 12시간 (오전8시~오후8시), 조도 200~300Lux의 동물 사육실에서 사료와 음용수를 급여하여 순화 및 시험기간 동안 격리 사육하였다.

##### ② 사육조건

순화 및 시험기간 중 스테인레스제 사육 상자 (500× 300× 200mm)에 2 마리씩 넣어 사육하였다.

##### ③ 사료 및 음용수

사료는 대한바이오링크사의 실험동물용 마우스사료를, 물은 자외선 살균처리 된 음용수를 자유섭취 시켰다.

#### (마) 개체식별

개체 식별은 꼬리에 유성매직을 사용하여 일련번호로 표시하였으며, 사육상자에 시험번호, 군번호, 개체번호를 기재한 개체식별카드를 부착하였다.

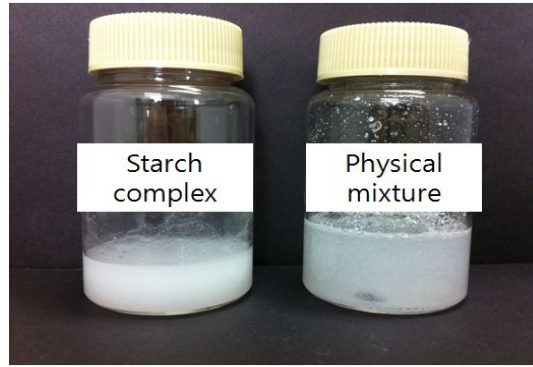
#### (바) 시험물질의 투여경로 및 방법

경구경로를 선택하여 투여하였고, 경구투여용 주사기(존데)를 이용하여 위내에 1회 강제 투여하였다.

### (3) 분석

#### (가) 혈액의 채취

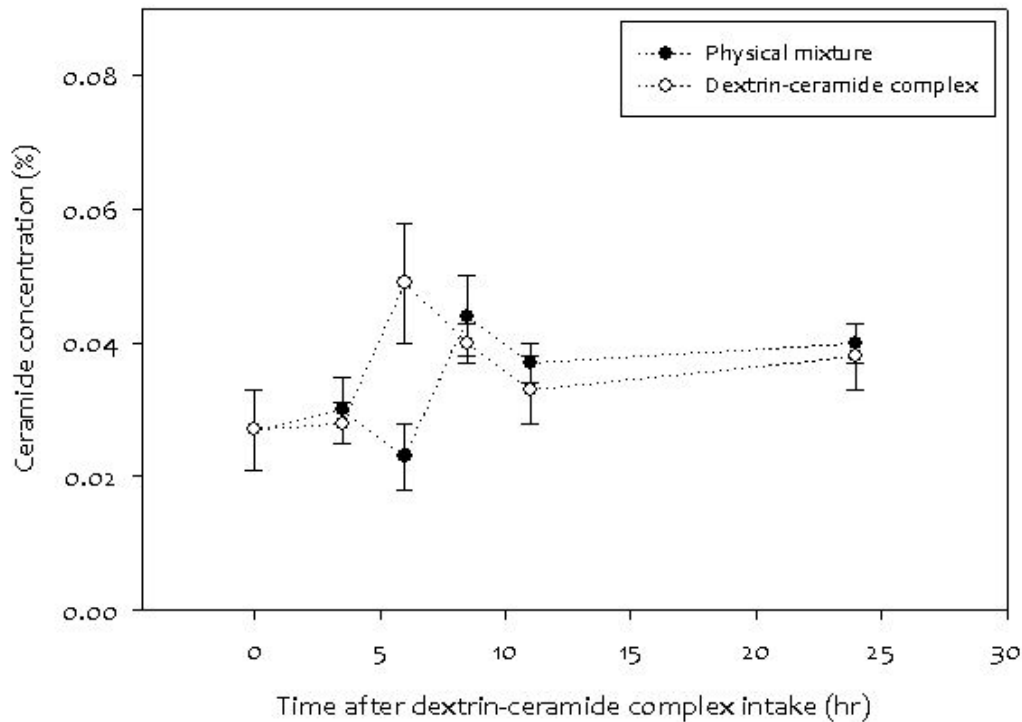
경구투여 후 0, 3.5, 6, 8.5, 11, 24시간 뒤 CO<sub>2</sub> 흡입으로 마취시킨 뒤 단두(Decapitation)하여 혈액을 채취했으며 채취된 혈액은 serum으로 분리 후 분석 전까지 -20℃에서 보관한다.



[그림 3] 경구투여용 시료

(Left: dextrin-ceramide complex solution, Right: physical mixture (standard))

SD rat 에 대한 세라마이드의 생체이용성 평가에 경구 투여용 시료는 그림 3와 같다. 복합체형성으로 제조된 시료는 균일한 분산액으로 형성하고 있지만, 동일 농도의 physical mixture(standard)의 경우에는 세라마이드가 뜨는 양상을 보인다. 이러한 시료로 경구 투여 후 채혈된 serum을 분석한 결과는 그림 4과 같다.



[그림 4] 채혈 시간에 따른 세럼 내의 세라마이드 농도

(0, 3.5, 6, 8.5, 11, and 24 hr, respectively). The rats were orally administrated dextrin-ceramide complexes (white circles) or dextrin mixed with ceramide (black circles)

- Serum 안에서 세라마이드가 방출되는 수준을 쥐에게 경구투여 후 24시간 동안 테스트해 보았다. 처음 0, 3.8시간에는 실험군과 대조군 사이에 큰 차이가 없었다. 하지만 6시간에는 대조군과 실험군 사이의 흡수율 차이가 뚜렷하게 나타났다. 덱스트린-세라마이드 복합체의

경우 세라마이드의 농도는 0.05%로 최고치를 나타냈다. 그 이후의 흡수율은 감소하는 경향을 보였다. 대조군인 physical mixture의 경우 6시간에 상대적으로 낮은 흡수율을 보였다. 이는 텍스트린-세라마이드 복합체의 경우 생체이용률이 더 높다는 것을 의미한다. 하지만 8.5시간부터는 대조군과 실험군의 흡수율이 거의 비슷한 수준으로 감소하는 것이 관찰됐다.

## 7절 나노 전분 복합체의 소재, 음료개발

### 1. 최적의 배합비 선정

개발된 세라마이드 나노전분 복합체를 첨가하여 음료를 제조하기 위한 배합비 선정 실험이 수행되었다. 일반적으로 음료는 색, 맛, 향, 질감, 투명도 등의 요인으로 평가될 수 있는데 첨가되는 원료가 갖는 고유의 특성을 향상 시키는가, 저감시키는가에 따라 배합비가 고려되어야 할 것이다.

세라마이드 음료의 용량은 100 mL 기준으로 제조되었으며 갈색 유리병에 제조되었다. 세라마이드 음료 1병에는 기능성이 인정되는 세라마이드 1일 섭취량인 34 mg보다 많은 36 mg이 함유되도록 60%의 세라마이드를 포함하고 있는 세라마이드 나노전분 복합체를 0.06% 첨가하였으며 실험에 사용된 세라마이드 음료의 배합비는 표 1에 나타내었다.

[표 1] 최적의 세라마이드 음료 배합비 선정

1		2		3	
원료	합량	원료	합량	원료	합량
세라마이드	0.06	세라마이드	0.06	세라마이드	0.06
전분나노복합체(60%)		전분나노복합체(60%)		전분나노복합체(60%)	
자일리톨	3.20	감식초	4	결정과당	15.0
솔비톨액	1.00	액상과당	10.6437	자일리톨	0.6
액상과당	1.50	폴리 텍스트로스	3	사과산	0.5
구연산	0.32	비타민B2	0.00051	구연산	0.35
사과산	0.08	벌꿀	0.47801	비타민 C	0.15
피리독신염산염	0.05	구연산	0.01912	구연산나트륨	0.04
니코틴산아미드	0.01	구연산나트륨	0.01912	비타민 B6 염산염	0.003
수크랄로스	0.01	L-멘톨	0.0001434	비타민 B1 염산염	0.0003
비타민 C	0.15	레드L-500	0.054173	정제수	83.7967
정제수	93.62	비타민C	0.03824		
		스테비덴후레쉬	0.01912		
		니코틴산아미드	0.00956		
		정제수	81.6583		
Total	100	Total	100	Total	100

## 2. 최적의 기호성 연구

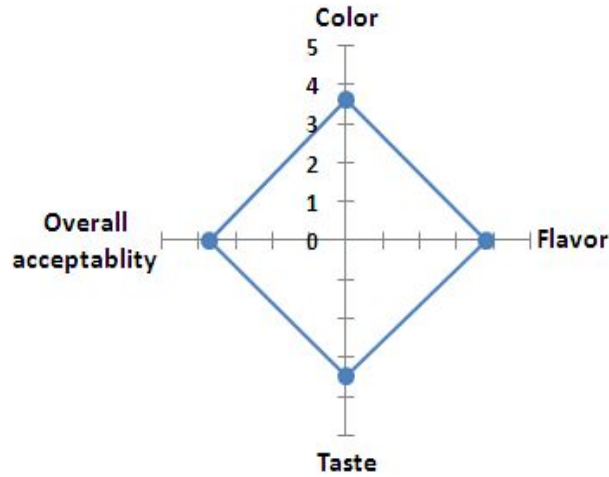
선정된 세라마이드 음료 배합비를 기본으로 하고 바나나 맛, 사과 맛, 요구르트 맛의 3가지 맛을 갖는 세라마이드 음료를 개발하였으며 3가지 향의 함량을 조절하여 최적의 기호성을 갖는 함량을 도출하였다.

### 가. 바나나 맛 세라마이드 음료의 최적의 기호성 연구

바나나 향을 첨가하여 제조한 바나나 맛 세라마이드 음료를 제조하였다. 또한 바나나 향의 함량을 조절하여 최적의 기호성을 갖는 배합비를 찾기 위한 실험이 수행되었으며 최적의 배합비는 표 2와 같으며, 관능검사 결과는 그림 1에 나타내었다.

[표 2] 바나나 맛 세라마이드 음료 배합비

원료	함량
세라마이드 나노전분 복합체(60%)	0.06
감식초	4
액상과당	10.6437
폴리텍스트로스	3
바나나농축액	1.4659
벌꿀	0.47801
구연산	0.01912
구연산나트륨	0.01912
바나나 향	0.1912
레드L-500	0.054173
비타민C	0.03824
스테비텐후레쉬	0.01912
니코틴산아미드	0.00956
비타민B2	0.00051
L-멘톨	0.0001434
정제수	80.001203
Total	100



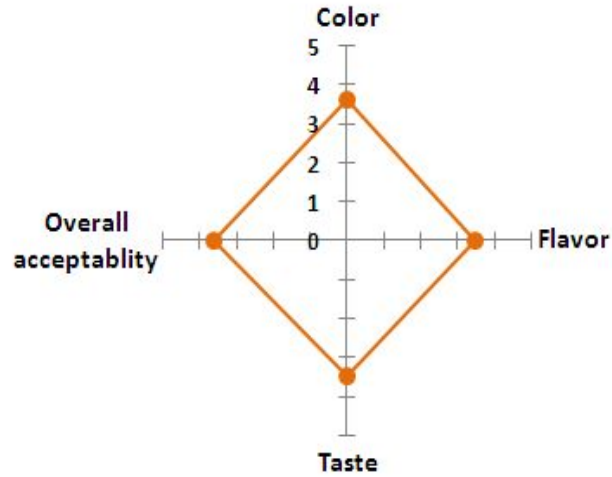
[그림 1] 바나나 맛 세라마이드 음료의 관능 검사 결과

나. 사과 맛 세라마이드 음료의 최적의 기호성 연구

사과 향을 첨가하여 제조한 사과 맛 세라마이드 음료를 제조하였다. 또한 사과 향의 함량을 조절하여 최적의 기호성을 갖는 배합비를 찾기 위한 실험이 수행되었으며 최적의 배합비는 표 3과 같으며, 관능검사 결과는 그림 2에 나타내었다.

[표 3] 사과 맛 세라마이드 음료 배합비

원료	함량
세라마이드 나노전분	0.06
복합체(60%)	
감식초	4
액상과당	10.6437
폴리덱스트로스	3
사과농축액	1.4659
벌꿀	0.47801
구연산	0.01912
구연산나트륨	0.01912
사과향	0.1912
레드L-500	0.054173
비타민C	0.03824
스테비텐후레쉬	0.01912
니코틴산아미드	0.00956
비타민B2	0.00051
L-멘톨	0.0001434
정제수	80.001203
Total	100



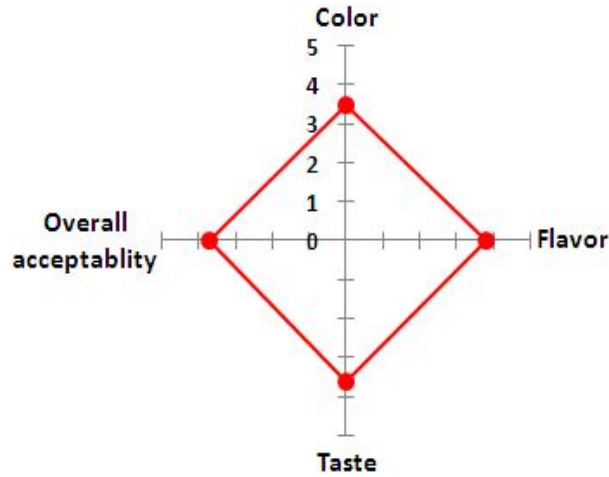
[그림 2] 사과 맛 세라마이드 음료의 관능 검사 결과

다. 오미자 맛 세라마이드 음료의 최적의 기호성 연구

오미자 향을 첨가하여 제조한 오미자 맛 세라마이드 음료를 제조하였다. 또한 오미자 향의 함량을 조절하여 최적의 기호성을 갖는 배합비를 찾기 위한 실험이 수행되었으며 최적의 배합비는 표 4와 같으며, 관능검사 결과는 그림 3에 나타내었다.

[표 4] 오미자 맛 세라마이드 음료의 배합비

원료	함량
세라마이드 나노전분	0.06
복합체(60%)	
감식초	4
액상과당	10.6437
폴리텍스트로스	3
오미자농축액	1.4659
별꿀	0.47801
구연산	0.01912
구연산나트륨	0.01912
오미자 향	0.1912
레드L-500	0.054173
비타민C	0.03824
스테비텐후레쉬	0.01912
니코틴산아미드	0.00956
비타민B2	0.00051
L-멘톨	0.0001434
정제수	80.001203
Total	100



[그림 3] 오미자 맛 세라마이드 음료의 관능 검사 결과



[그림 4] 바나나, 사과, 오미자 맛 세라마이드 음료

## 8절 나노 전분 복합체의 소재, 화장품개발

### 1. 최적의 배합비 선정

세라마이드 나노전분 복합체를 기능성 소재로 하는 천연 화장품을 제조하기 위하여 배합비 선정 실험을 수행하였다. 화장품의 경우 일반적으로 유화안정성이 우선시 되기 때문에 제조 후 크리밍현상이나 유상층과 수상층의 분리도를 확인해 가장 최적의 배합비를 평가하였다.

#### 가. 세라마이드 전분 복합체가 함유된 로션 배합비 선정

국내의 세라마이드 화장품의 경우 0.1~0.5%의 적은 세라마이드가 함유되어있다. 따라서 본 연구는 고농도의 세라마이드의 화장품을 제조하고자 세라마이드 전분 복합체의 함량을 3%로 첨가하였으며 로션의 경우 수상층의 워터와 알로에 베라겔 함량을 조절하며 배합을

수정하였으며 세라마이드와 더불어 피부 보습에 도움을 줄 수 있는 낫또 모이스트를 함유하였다. 실험에 사용된 로션의 배합비는 표 1에 나타내었다. 로션을 제조 후 유화안정성을 분리도와 크리밍 현상을 관찰하여 가장 안정한 상태의 로션을 최적의 배합으로 선정하였다.

[표 1] 세라마이드 전분 복합체 로션 배합비

세라마이드 전분 복합체 로션				
구분	원 료 명		(% )	
수상층	유기농 로즈 워터	25	30	35
	위치헤이즐 워터	8	8	0
	알로에 베라겔	8	8	11.6
첨가물	낫또 모이스트	45.6	40.6	40
	세라마이드 나노복합체	3	3	3
	나프리 보존제	10	10	10
	Vitamin E	0.4	0.4	0.4
Total		100	100	100

나. 세라마이드 전분 복합체가 함유된 아이크림 배합비 선정

세라마이드 전분 복합체를 함유한 아이크림의 배합비는 표 2에 나타내었다. 아이크림의 경우 세라마이드 전분 복합체 함량을 3%로 고정하고 유상층에 오일 배합을 최적의 배합으로 나타내고자 마카다미아, 호호바, 로즈힙 오일의 함량을 달리 처방하였다. 이때 최적의 배합비를 아이크림의 유화 안정성을 통해 선정하였다.

[표 2] 세라마이드 아이크림 배합비

세라마이드 아이크림				
구분	원료명		%	
유상층	마카다미아오일	6.6	4	2
	유기농 호호바 오일	4	6.6	4
	유기농 로즈힙 오일	2	2	6.6
수상층	올리브 유화왁스	6	6	6
	정제수	60	60	60
	낫또모이스트	8	4	0
첨가물	푸코겔	0	4	8
	에코프리 보존제	10	10	10
	세라마이드 나노복합체	3	3	3
	Vitamin E	0.4	0.4	0.4
		100	100	100

다. 세라마이드 전분 복합체가 함유된 안티링클밤 배합비 선정

세라마이드의 피부 보습 기능을 극대화하고자 건조 시 바디와 입술에도 사용할 수 있는



밤(balm)타입의 화장품을 제조하였다. 세라마이드 전분 복합체가 함유된 안티링클밤의 경우 오일과 왁스의 비율을 달리하여 처방하였으며 처방된 조건에서 밤의 안정성과 발림성을 토대로 최적의 배합비를 선정하였다. 실험된 배합비는 표 3에 나타내었다.

[표 3] 세라마이드 안티링클밤 배합비

세라마이드 안티링클밤				
구분	원료명	(%)		
유상층	마카다미아오일	40	42	45
	유기농시어버터	6	6	5
	유기농비즈왁스	14	14	13.3
	유기농타마누오일	20	18	13
	유기농 꿀든 호호바 오일	16.6	16.6	20
첨가물	세라마이드 나노복합체	3	3	3
	Vitamin E	0.4	0.4	0.7
		100	100	100

## 2. 최적의 기호성 선정

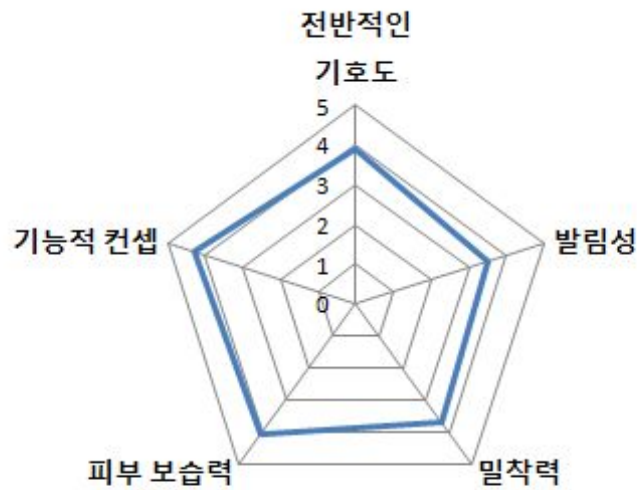
3종의 배합비로 제조된 화장품의 유화안정성을 확인 후 가장 안정한 화장품을 평가 기호성 평가 대상으로 삼았다. 평가는 관능적 평가로 진행하였다. 화장품은 기본적으로 발림성, 밀착력, 끈적임이 관능적 평가 요소로 사용되며 세라마이드의 주된 기능성인 피부 보습력에 대한 평가도 함께 진행하였다. 평가는 5점 척도법으로 진행하였다.

### 가. 세라마이드 전분 복합체가 함유된 로션의 기호성 선정

평가된 로션은 그림 1에 나타내었다. 로션을 가지고 관능 평가를 진행한 결과 로션의 경우 전반적인 기호도가 PI 3.9/5.0 이상 평가되었다. 피부 보습력에 대한 평가는 PI 4.1/5.0으로 우수한 결과를 나타내었다. 자세한 내용은 그림 2에 나타내었다. 향후 시제품 개발에 있어 밀착력과 보습력 부분을 보완 후 시제품을 생산할 것이다.



[그림 1] 세라마이드 전분 복합체 로션



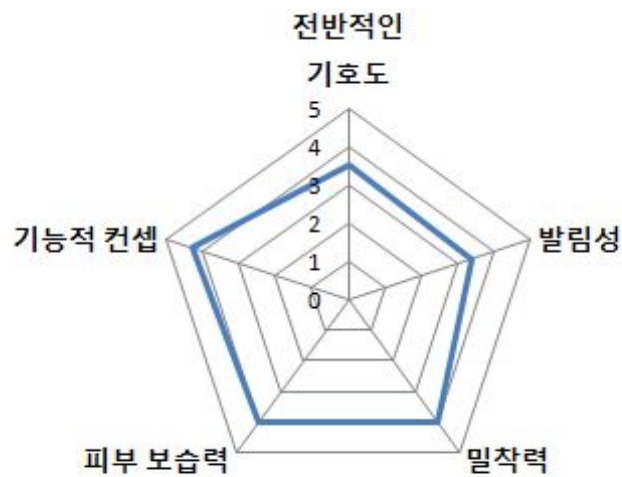
[그림 2] 세라마이드 전분 복합체 로션의 관능 검사 결과

나. 세라마이드 전분 복합체가 함유된 아이 크림의 기호성 선정

평가된 아이크림은 그림 3에 나타내었다. 아이크림의 경우 밀착력에서는 로션보다 우수한 결과를 보였으나 전반적인 기호도가 다소 낮게 평가되었다. 자세한 내용은 그림 3에 나타내었다. 향후 시제품 개발에 있어 아이크림의 밀착력을 토대로 배합을 개선해 나아갈 예정이다.



[그림 3] 세라마이드 전분 복합체 아이크림



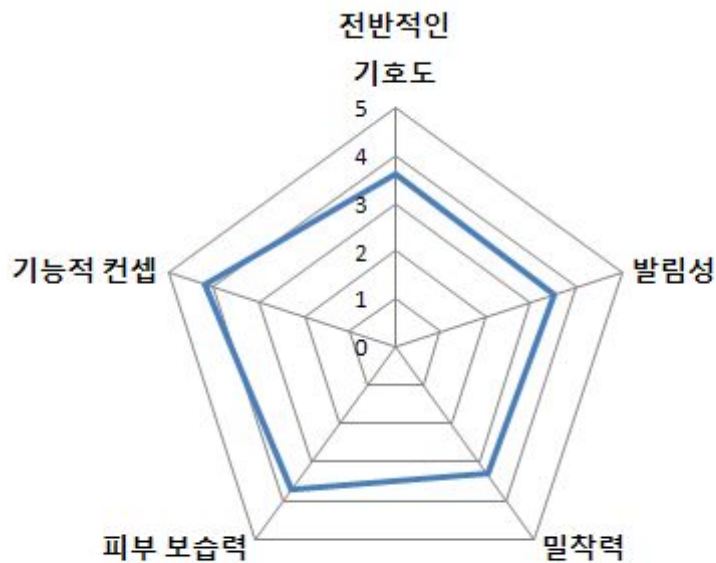
[그림 4] 세라마이드 전분 복합체 아이크림 관능 평가 결과

다. 세라마이드 전분 복합체가 함유된 안티링클밤의 기호성 선정

평가된 아이크림은 그림 5에 나타내었다. 세라마이드 피부보습 효과를 보다 극대화 하고자 balm타입의 화장품은 제조하였으나 피부 보습력 부분에서 로션과 아이크림보다 낮게 평가되었다. 따라서 다른 오일이나 왁스에 대한 영향을 함께 처리하는 것보다는 세라마이드를 단독으로 사용할 것으로 사료된다. 자세한 평가 결과는 그림 6에 나타내었다.



[그림 5] 세라마이드 안티링클밤



[그림 6] 세라마이드 전분 복합체 안티링클밤의 관능 평가 결과

최종적으로 세라마이드 나노전분 복합체를 소재로 하는 천연 화장품을 총 3종(로션, 아이크림, 안티링클밤) 개발하였다. 개발된 화장품은 천연 원료를 사용하여 만든 화장품으로 최근, 과량의 방부제와 보존제로 사용으로 인해 문제가 되고 있는 점을 보완하여 천연원료 및 천연의 방부제를 사용하여 화장품 3종을 개발하였고 이는 냉장보관하면서 사용하는 화장품으로 천연의 원료를 보다 오래 유지하기 위함이다. 이를 통해 3차년도에 화장품의 저장안정성을 통해 화장품의 보다 안정한 상태를 확인하고자 한다. 또한 3종의 화장품 기호성 평가를 토대로 시제품 생산전에 화장품 배합을 보완할 예정이다.

## 9절 완제품에 대한 저장안정성 평가

### 1. 세라마이드 나노전분 복합체 음료의 저장성 평가

#### 가. 재료 및 방법

##### (1) 시료

본 연구에서 사용한 세라마이드 나노전분 복합체는 제 1세부(뉴트리)에 의해 제조된 음료를 사용하였으며, 음료를 멸균된 유리병에 소분하여 4, 25, 40℃에 보관하면서 실험에 사용하였다.

##### (2) 실험 방법

###### (가) 분산안정성

제조된 음료를 10 mL 메스실린더에 보관 후 가라앉은 복합체의 양을 눈금으로 측정하고 사진촬영 하였다.


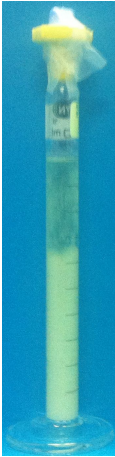
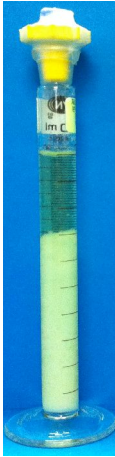
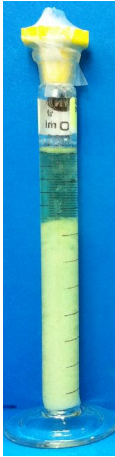
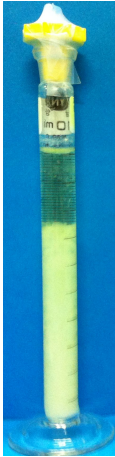
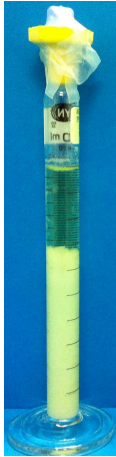
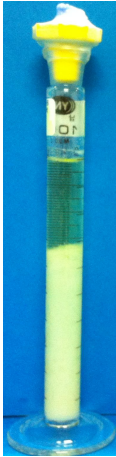
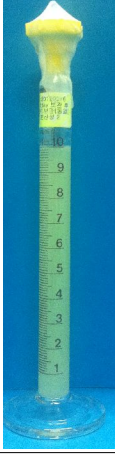
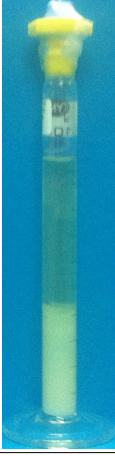






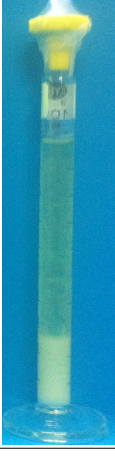
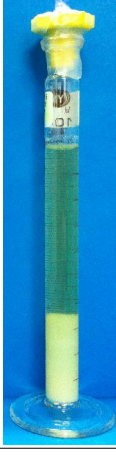

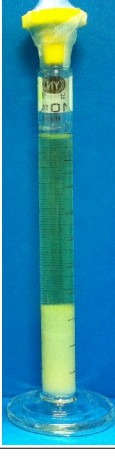

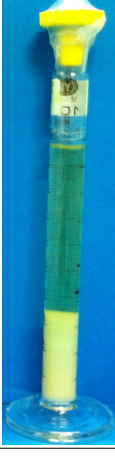
###### (나) 세라마이드 함량

보관된 음료 5 mL 중 아래에서부터 3 mL을 취하고 동결건조 후 sieving한 샘플 2 mg씩 취하고 Isopropyl alcohol 2 mL에 분산시킨 후 50℃에서 1시간 동안 세라마이드를 추출한 후 HPLC로 정량하였다.

#### 나. 연구 결과

##### (1) 분산안정성

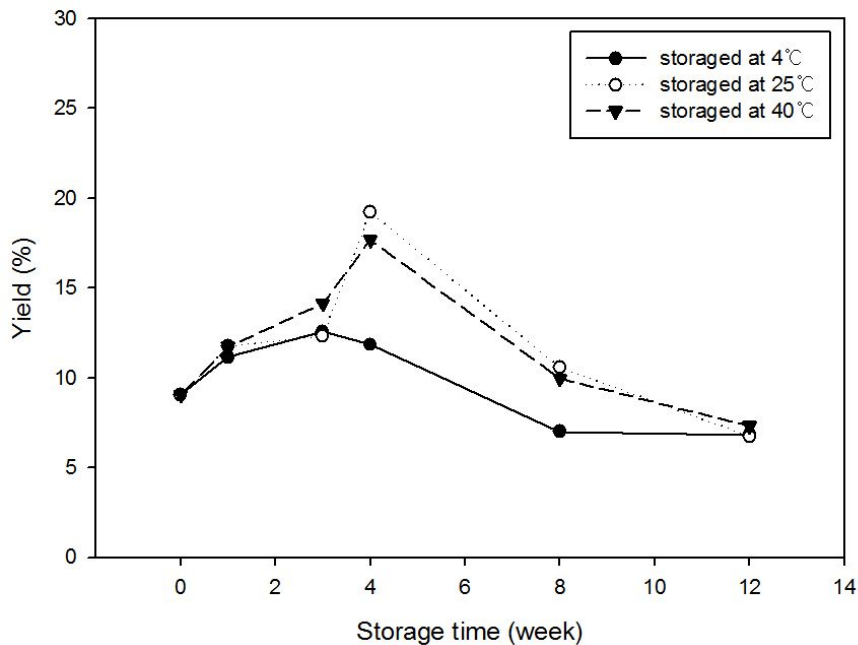
세라마이드 나노전분 복합체를 함유한 음료는 4, 25, 40℃에서 보관되며 메스실린더에서 분산안정성이 사진으로 촬영되었다(그림 1). 음료내의 복합체는 aggregation하려는 성질 때문에 저장 후 1주에서부터 가라앉은 것을 확인하였다. 또한 저장온도가 높을수록 분산되는 복합체의 양이 더 크게 증가하였다. 또한 저장기간이 길어질수록 가라앉은 복합체의 높이는 크게 달라지지 않았다. 하지만 가라앉은 복합체는 흔들어주면 다시 물에 쉽게 풀렸기 때문에 복합체 섭취에는 큰 지장이 없는 것으로 사료된다. 하지만 더 안정적인 음료의 성상을 위하여 안정한 분산안정성 연구가 향후 더 진행되어야 할 것이다.

Storage Temp.(°C)	Storage time (week)						
	0	1	2	3	4	8	12
4							
25							
40							

[그림 1] 12주동안 4, 25, 40°C에서 저장된 세라마이드 음료의 분산안정성 형상

## (2) 세라마이드 함량

세라마이드 나노전분 복합체가 함유된 음료는 저장기간에 따라 다른 양상을 보였다. 세라마이드의 함량을 분석하기 위하여 시료를 채취할 때 샘플을 아래에서부터 5 mL을 취하였다. 이때, 세라마이드 나노전분 복합체가 저장기간에 따라 가라앉은 양상을 나타내었기 때문에 저장기간에 따라 함량을 가져왔다. 저장온도가 높아질수록 가라앉은 복합체의 높이가 낮다. 즉, 이는 가라앉은 복합체의 함량의 밀도가 높은것으로 사료된다. 4℃은 대략 가라앉은 복합체의 함량이 7 cm 정도 이지만 40℃에서는 약 3 cm이다. 따라서 샘플을 아래에서 5 mL을 취할 경우 세라마이드의 밀도가 높아 더 많은 세라마이드의 함량이 분석되었다. 따라서 그림 2에 나타난바와 같이 저장기간이 4주까지는 복합체의 함량이 증가하는 원인이 바로 이와 같은 이유로 사료된다. 이후 8주, 12주에서 복합체의 함량이 감소하는 것은 복합체가 깨짐으로써 복합체의 함량이 감소하는 것으로 사료된다.



[그림 2] 12주 동안 4, 25, 40℃에 저장된 세라마이드 음료의 유효성분 함량 분석

## 2. 세라마이드 나노진분 복합체 음료의 안정성 평가

### 가. 재료 및 방법

#### (1) 시료

본 연구에서 사용한 세라마이드 나노진분 복합체는 제 1세부(뉴트리)에 의해 제조된 음료를 사용하였으며, 음료를 멸균된 유리병에 소분하여 4, 25, 40℃에 보관하면서 실험에 사용하였다.

#### (2) 실험 방법

##### (가) pH 안정성

액상 복합체(음료)를 5 mL씩 바이알에 보관 후 1N HCl, 1N NaOH, 10N NaOH를 사용하여 pH 2, 4, 6, 8, 10, 12로 각각 조절하고 3시간 상온에서 보관 후 세라마이드 함량과 입도 변화 및 분산성을 확인하였다.

##### ① 세라마이드 함량

보관 된 5 mL 중 아래에서부터 3 mL를 취하고 동결건조 후 sieving한 샘플 2 mg씩 취하고 Isopropyl alcohol 2 mL에 분산시킨 후 50℃에서 1시간 동안 세라마이드를 추출한 후 HPLC로 정량하였다.

##### ② 입도

보관 된 5 mL 중 아래에서부터 1 mL를 취하고 증류수 9 mL를 넣어 희석한 뒤 Zetasizer Nano ZS (Zen 3600, Malvern, U.S.A)로 측정하였다.

##### ③ 분산성

10 mL 메스실린더에 보관된 가라앉는 복합체의 양을 사진 촬영하였다.

##### (나) 열 안정성

음료를 5 mL씩 바이알에 보관 후 60, 80, 100, 120℃에서 각각 20분 보관 후 세라마이드의 함량과 입도 변화 및 분산성을 확인하였다.

##### (다) 동결용융 안정성

음료를 5 mL씩 바이알에 보관 후 -20, -60℃에서 각각 하루 보관 후 해동 시킨 뒤 세라마이드의 함량과 입도 변화 및 분산성을 확인하였다.

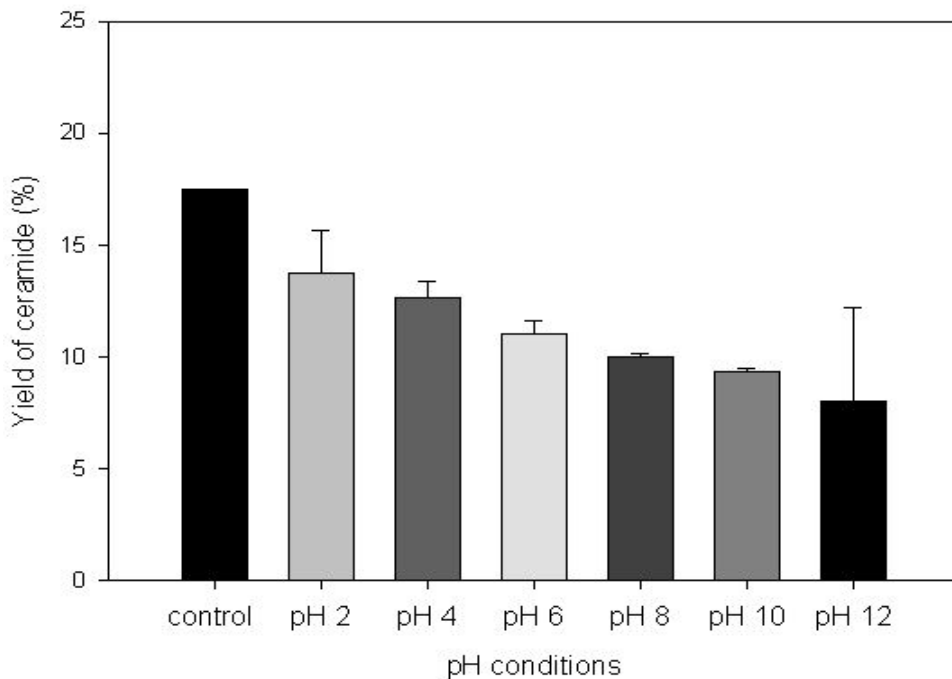


## 나. 연구 결과

### (1) pH 안정성

#### (가) 세라마이드 함량

세라마이드 나노전분 복합체의 pH에 따른 세라마이드의 함량변화는 그림 3에 나타내었다. 대조군과 비교했을 때 pH가 증가함에 따라 세라마이드 함량이 감소하는 추세를 보였다. 하지만 그 차이가 미미하여 큰 의미는 없다고 사료된다.



[그림 3] pH에 따른 세라마이드 음료의 유효성분 함량 변화

#### (나) 분산성

pH 조절에 따른 복합체의 분산성을 확인한 결과는 그림 4에서 보는 바와 같다. pH 2~10 에서는 음료의 색에 있어서 뚜렷한 차이를 보이지 않았으며, 가라앉는 침전물의 양도 큰 차이가 없는 것으로 나타났다. 하지만, pH 12의 경우 확연하게 다른 음료의 색 (진갈색)이 나타났고, 침전물의 양 또한 급격히 감소했다. 이는 pH 12에서 복합체가 불안정하여 구조적 변화가 일어난 결과로 사료된다. 즉, 제조된 음료는 비교적 강한 산과 알칼리 등의 넓은 pH 범위에서 안정성이 확보된다고 할 수 있다.

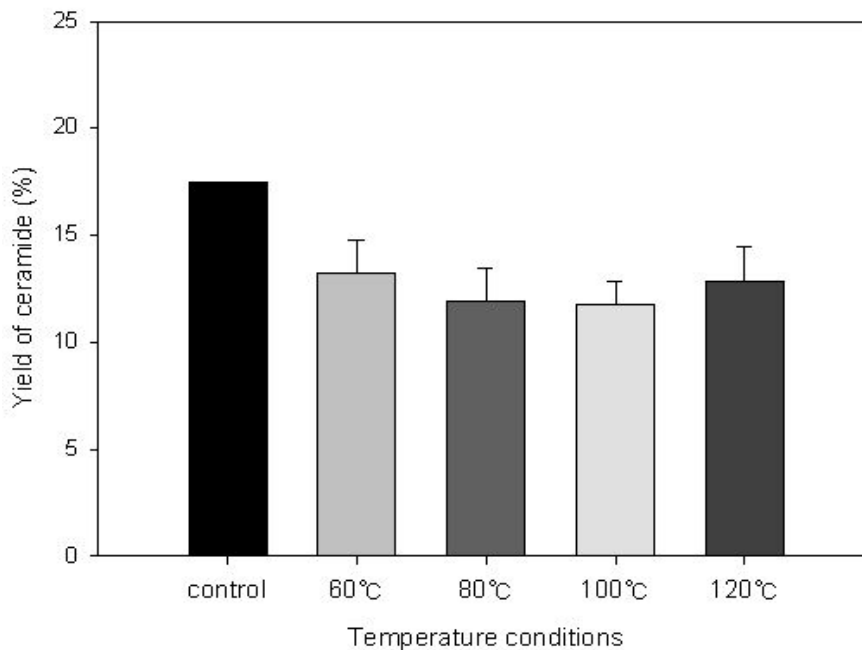


[그림 4] pH에 따른 세라마이드 음료의 분산안정성

## (2) 열안정성

### (가) 세라마이드 함량

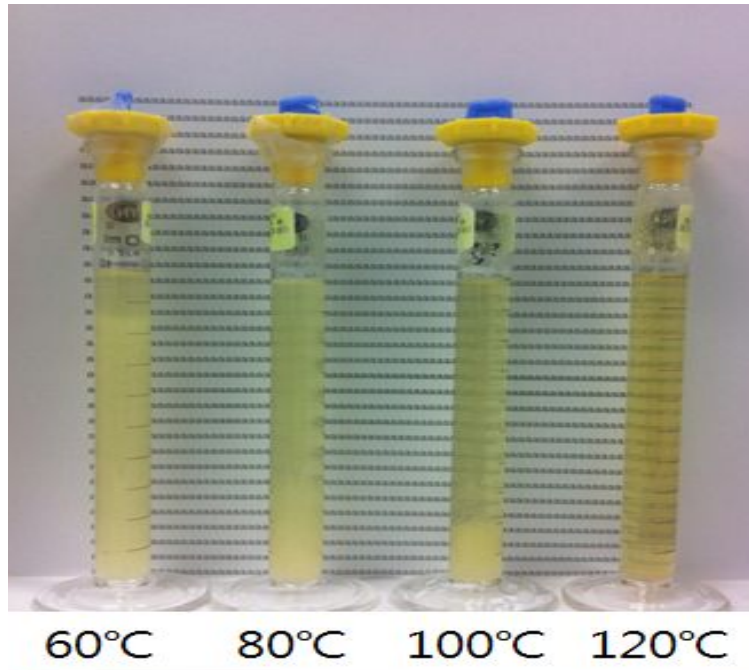
액상 세라마이드 나노진분 복합체의 내열성에 따른 세라마이드 함량 결과는 그림 5에 나타났다. 그림에서 볼 수 있듯이, 대조군과 비교했을 때 열처리에 따라 세라마이드 함량이 전반적으로 감소하는 추세를 보였다. 하지만 그 차이는 pH와 마찬가지로 미미하다고 사료된다. 80°C 이상으로 열처리를 하게 될 경우 복합체의 dissociation이 일어나 세라마이드는 액상 위로 뜨게 되고 그에 따른 손실이 나타나 세라마이드의 함량이 감소되는 것으로 사료된다. 상기 텍스트린-세라마이드 복합체의 이화학적 특성 부분에 제시한 시차주사열량계를 이용한 DSC 결과상의 초기개시온도 ( $T_0$ )가 75°C 정도임을 이를 입증해주는 좋은 예라고 할 수 있다.



[그림 5] 열처리 온도에 따른 세라마이드 음료의 유효성분 함량 변화

### (나) 분산안정성

액상 세라미이드 나노전분 복합체의 내열성에 따른 분산안정성 결과는 그림 6에 제시하였다. 촬영된 사진을 통해서 알 수 있듯이, 온도가 높아질수록 침전되는 복합체의 양이 감소하며 음료자체가 투명해지는 것을 확인할 수 있다. 특히 가장 높은 온도인 120℃에서 전분의 용해도가 높아짐에 따라 분산안정성이 크게 증가하는 것을 확인하였다.

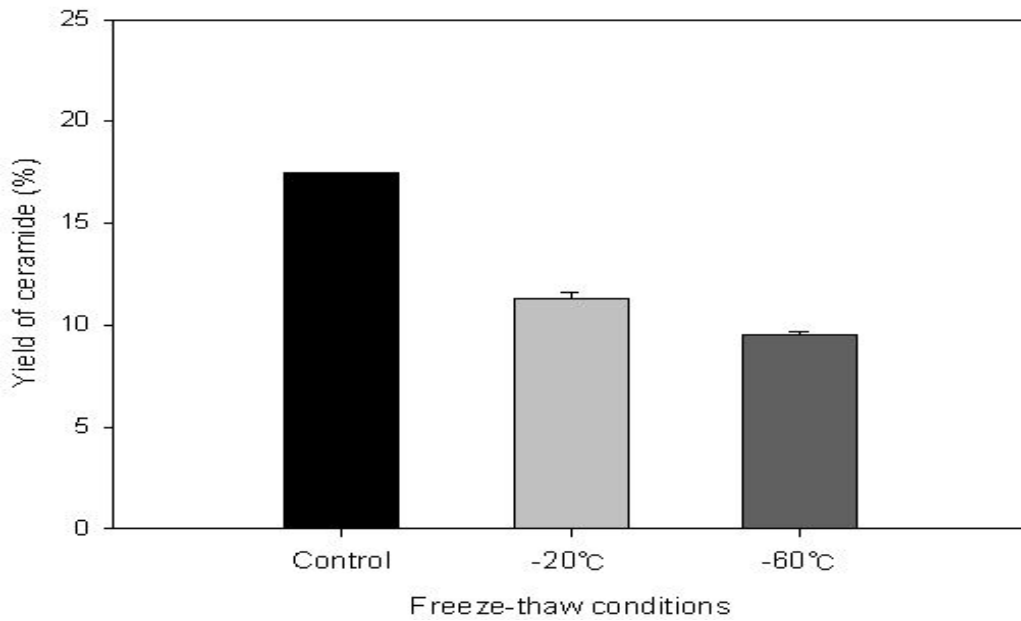


[그림 6] 열처리 온도에 따른 세라미이드 음료의 분산안정성

### (3) 동결용융 안정성

#### (가) 세라미이드 함량

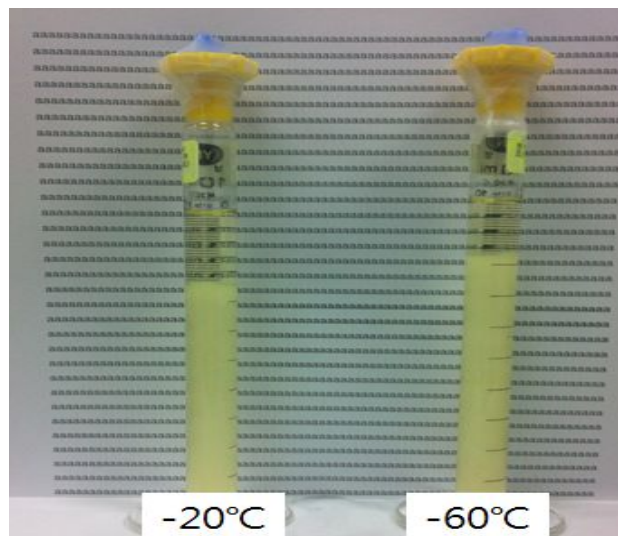
액상 세라미이드 나노전분 복합체의 동결용융안정성에 따른 세라미이드 함량 결과는 그림 7에 제시하였다. 세라미이드의 함량은 pH, 내열성 실험과 마찬가지로 실험군에서 감소하는 경향을 보였다. 특히 -20℃에서 보다 -60℃에서 더 크게 세라미이드 함량이 감소했다. 이는 동결속도의 차이로 사료된다.



[그림 7] 동결 온도에 따른 세라마이드 음료의 유효성분 함량 변화

(나) 분산안정성

액상 나노진분 복합체의 동결용융안정성에 따른 분산안정성 결과는 그림 8에 나타내었다. 그 결과 동결온도에 따라 가라앉는 침전물의 양이 크게 달라지지 않음을 확인할 수 있었다. 따라서 텍스트린-세라마이드 복합체 음료는 동결용융에도 안정성을 보인다고 할 수 있으며, 음료로 활용 시 그 이용범위가 넓다고 할 수 있다.



[그림 8] 동결 온도에 따른 세라마이드 음료의 분산안정성

### 3. 세라마이드 나노전분 복합체 화장품의 저장안정성 평가

#### 가. 재료 및 방법

##### (1) 시료

화장품에 사용된 세라마이드 나노전분 복합체는 제 1협동(고려대)에 의해 제조되었으며 이를 가지고 제 1세부((주)뉴트리)에서 제조한 로션, 아이크림, 안티 링클 밤을 저장안정성 평가에 사용하였다.

##### (2) 실험방법

###### (가) 표면균음

로션, 아이크림, 안티 링클 밤 각각의 샘플 표면을 0.5 g 취하여 AOAC방법으로 10 5℃에서 건조 후 상온에서 측정하였다.

###### (나) pH

로션과 아이크림의 시료 0.5 g에 정제수를 첨가하여 총 5 g으로 맞추고 혼합한 후 용액의 pH를 측정하였다. pH meter(pH510, EUTECH, Singapore)를 사용하여 25±1℃에서 3회 반복 측정 하였다.

###### (다) 입도

화장품의 지방구 크기 및 에멀전의 크기는 입도 분석기 (Zetasizer Nano ZS (Zen 3600, Malvern, U.S.A)로 측정하였다. 상온에 보관한 화장품 시료 1 g을 취하여 증류수 9 mL에 분산시켜 균질화 한 후, 1 mL를 취하여 전용 cell에 담아 측정하였다.

###### (라) 외관의 변취, 변색

저장된 시료의 냄새 변화, 색상 변화 및 외관 성상을 관능적으로 평가하였다.

#### 나. 연구 결과

화장품의 제조 사진은 그림 9에 나타내었다. 사진에 나타난 시료를 실험에 사용하였으며, 이를 저장함으로써 화장품의 저장안정성을 판단하고자 하였다.



[그림 9] 세라마이드-텍스트린 복합체가 함유된 화장품

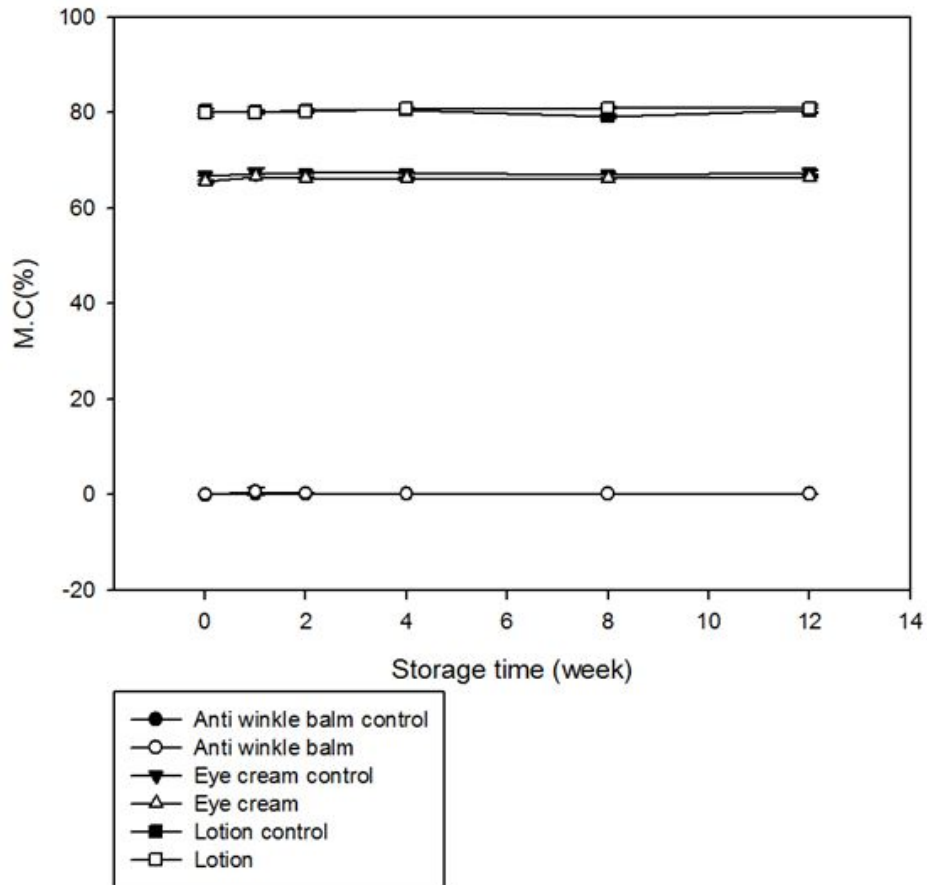
- A; anti wrinkle balm (L-control, R-with starch complex)
- B; eye cream (L-control, R-with starch complex)
- C; lotion (L-control, R-with starch complex)

(1) 표면균음

저장기간에 따른 표면균음은化妆품을 보관 중 증발로 인한 化妆품의 표면이 굳는 현상을 표면의 수분 함량 측정을 통해 분석하고자 하였다. 3종의 化妆품 표면균음 변화는 표 1 과 그림 10에 나타내었다. 안티 링클 밤, 아이 크림, 로션 모두 저장기간에 따른 수분 함량의 차이가 나타나지 않았다. 이는 유리병 용기에 化妆품이 보관된 만큼 수분 함량의 변화는 미비할 것으로 사료된다.

[표 1] 12주 동안 저장된 세라마이드-텍스트린 복합체가 함유된 化妆품의 표면균음 변화

storage time (week)	Moisture content (%)					
	anti wrinkle balm		eye cream		lotion	
	control	with starch complex	control	with starch complex	control	with starch complex
0	0.03±0.01	0.11±0.02	66.77±0.02	65.56±0.30	80.38±0.46	79.98±0.70
1	0.06±0.00	0.14±0.03	67.31±1.00	66.60±0.32	80.14±0.11	80.04±0.49
2	0.08±0.00	0.10±0.03	67.32±0.02	66.25±0.19	80.51±0.30	80.24±0.33
4	0.08±0.00	0.15±0.01	67.33±0.17	66.18±0.37	80.57±0.03	80.89±0.16
8	0.07±0.04	0.13±0.06	67.04±0.10	66.25±0.13	79.21±0.35	80.98±0.14
12	0.09±0.04	0.13±0.02	67.42±0.54	66.39±0.17	80.44±0.52	80.92±0.70



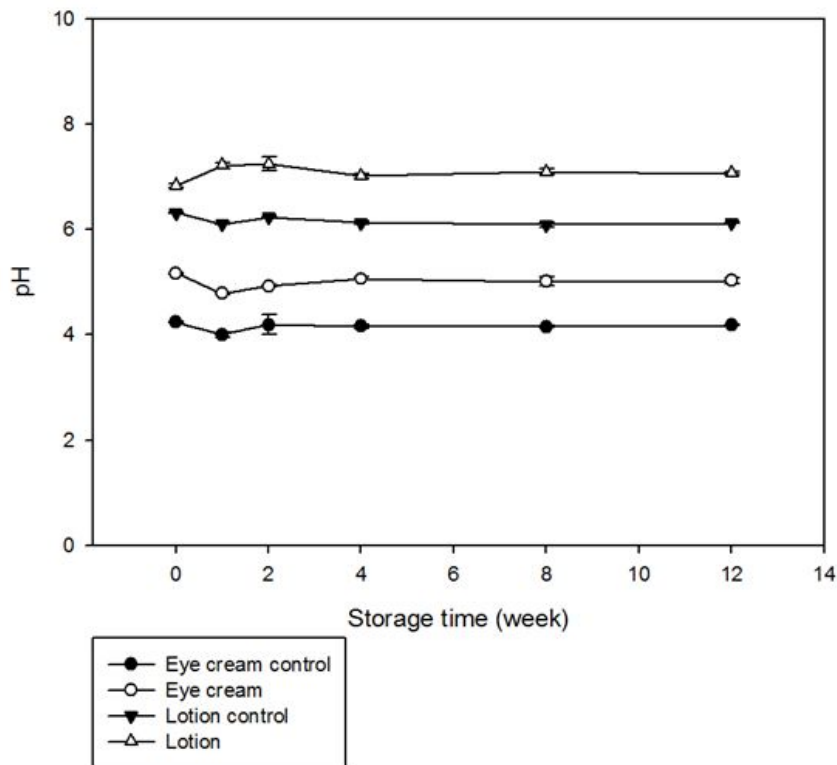
[그림 10] 12주 동안 저장된 세라마이드-텍스트린 복합체가 함유된 화장품의 표면균음

## (2) pH

저장기간에 따른 pH 변화는 표 2와 그림 11 나타내었다. pH의 변화를 통해 화장품의 미생물 성장 변화도 예측 가능하다. 아이 크림과 로션 모두 약산성의 pH 결과가 나타났으며, 사람의 피부 역시 마찬가지로 약산성을 띄고 있다. 따라서 제조된 화장품은 저장기간에 따른 pH의 유변학적 차이가 보이지 않았으며, 피부에 사용하기에 안정한 상태로 사료된다.

[표 2] 12주 동안 저장된 세라마이드-덱스트린 복합체가 함유된 화장품의 pH 변화

storage time (week)	pH			
	moisture cream		eye cream	
	control	with starch complex	control	with starch complex
0	4.24±0.01	5.17±0.02	6.32±0.01	6.84±0.04
1	4.00±0.05	4.79±0.02	6.10±0.01	7.21±0.05
2	4.19±0.19	4.93±0.02	6.24±.02	7.25±0.13
4	4.16±0.03	5.07±0.03	6.13±0.03	7.02±0.05
8	4.16±0.02	5.01±0.08	6.09±0.04	7.10±0.05
12	4.18±0.01	5.03±.06	6.13±0.01	7.07±0.02



[그림 11] 12주 동안 저장된 세라마이드-덱스트린 복합체가 함유된 화장품의 pH 변화

### (3) 입도

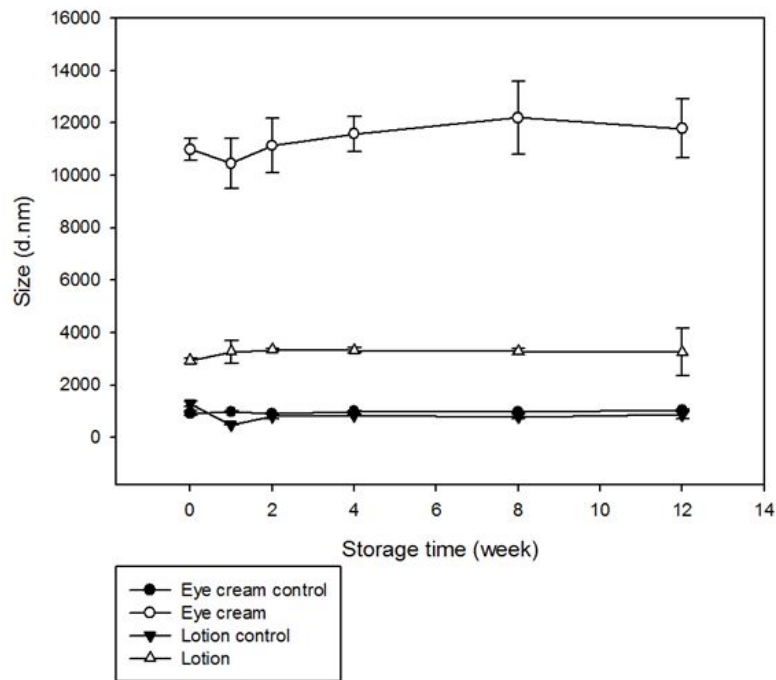
화장품의 입도 분포 결과는 표 3과 그림 12에 나타내었다. 화장품의 입도를 측정함에 따라 지방구의 크기, 에멀전의 크기 변화를 분석하고자 하였다. 12주간의 입도 측정 결과 대조군의 입도 size가 실험군 보다 현저히 작게 나왔으며 저장기간에 따른 차이는 미비한 것으로 판단된다. 이는 starch complex의 특성상 aggregation 하려는 성질이 강하기 때문에 이를 첨가한 화장품의 입도 사이즈가 더 큰것으로 사료된다. 하지만 제조된 복합체의



화장품 역시 저장기간에 따른 입도 변화가 크지 않아 복합체가 깨짐으로서 유화가 깨지는 현상은 없는 것으로 사료된다.

[표 3] 12주 동안 저장한 세라마이드-텍스트린 복합체가 함유된 화장품의 입자 사이즈 변화

storage time (week)	size(d.nm)			
	moisture cream		eye cream	
	control	with starch complex	control	with starch complex
0	920.5±91.6	10986.7±410.5	1286.0±99.9	2927.0±95.1
1	973±21.3	10450.7±955.7	487.6±14.9	3259.3±422.7
2	911.5±2.7	11136.7±1044.8	808.3±81.6	3332.3±56.9
4	991.1±10.5	11576.7±666.5	839.3±42.9	3318.3±107.4
8	965.7±19.3	12200.0±1388.4	791.4±83.0	3278.3±115.5
12	1037.9±51.9	11780.0±1126.5	865.6±52.1	3250.3±913.2



[그림 12] 12주동안 저장한 세라마이드-텍스트린 복합체가 함유된 화장품의 입자 사이즈 변화

(4) 외관의 변취, 변색

저장한 화장품의 육안 관찰 및 냄새 변화에 따른 결과는 표 4에 나타내었다. 대조군과 실험군 모두 12주차 까지 크림의 분리가 되는 과정인 크림링, 응집과 같은 현상이 관찰되지 않았으며 크림 성분들의 산화에 의한 특이취도 거의 없이 안정적으로 유지되었다. 또한 복합체가 깨짐으로써 빠져나온 세라마이드에 의한 유화 붕괴 현상도 나타나지 않았다.

[표 4] 12주 동안 저장한 세라마이드-텍스트린 복합체가 함유된 화장품의 관능적 성상 변화

storage time (week)	anti wrinkle balm		moisture cream		eye cream	
	control	with starch complex	control	with starch complex	control	with starch complex
0	○	○	○	○	○	○
1	○	○	○	○	○	○
2	○	○	○	○	○	○
4	○	○	○	○	○	○
8	○	○	○	○	○	○
12	○	○	○	○	○	○

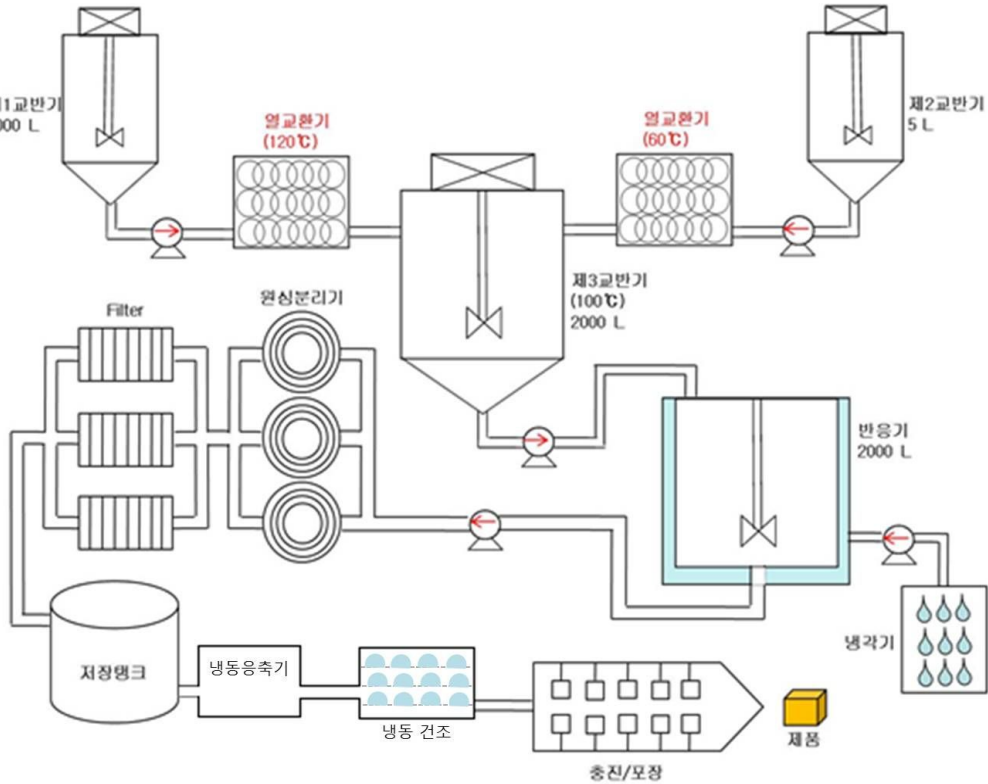
○; 변화 없음, X; 변화 있음.

위와 같은 결과를 토대로 세라마이드 나노전분 복합체가 함유된 화장품은 3개월간 안정성을 유지하며 유화의 깨짐이나 세라마이드의 용출이 나타나지 않은 채로 사용이 가능하다. 또한 최근 천연 화장품의 열풍에 따라 천연 원료로 화장품을 제조하며 방부제 역시 최소한의 양으로 사용하여 피부에 안정하게 사용 가능한 화장품인 것으로 사료된다.

# 10절 대량생산공정 확립

## 1. 대량생산 공정 확립

### 가. 제조 공정도



[그림 1] 대량 생산 제조 공정도

### 나. 대량생산 제조 방법

- 전체 제조라인은 생산규모를 반응물 1 톤/일로 가정하여 생산라인을 설계하였다.
- 2000 L의 제 1교반기에 1000 L의 정제수를 넣고, 982 kg의 텍스트린을 넣은 다음, 교반기를 이용하여 강하게 교반시킨다.
- 제2교반기에는 117 kg의 세라마이드을 넣고, Ethyl Alcohol 80 L를 넣은 후 교반기를 이용하여 잘 분산시킨다.
- 제1교반기의 텍스트린이 정제수에 잘 분산이 된 것을 확인한 다음 열교환기를 통해 120℃로 20분간 가열한 후 제3교반기로 이송한다.
- 제2교반기의 세라마이드 용액을 50℃의 열교환기를 통과시켜 온도를 올린 후 제3교반기로 이송한다.
- 이송된 텍스트린 용액과 세라마이드 용액을 제3교반기에서 90℃로 온도를 유지하면서 약12시간 동안 550rpm으로 교반시키면서 반응시킨다.
- 12시간의 교반이 끝나면 반응기로 이송한 후 서서히 실온까지 냉각시키면서 약 12시간

동안 일정한 속도로 교반하면서 반응시킨다.

- 반응이 끝난 반응물을 원심분리기로 이송시켜 약 5000×g에서 15분간 원심분리를 시킨다.
- 원심분리 된 침전물은 필터를 통과시킨 후 저장탱크로 이송시켜 보관한다.
- 저장탱크에 보관된 침전물은 동결건조 하여 분말화된 시료를 충전 포장하여 분말시료로 출하시킨다.

## 2. 경제적 시스템 개발

### 가. 원가 책정

견적산출서		발주 수량	단위중량	중량	포장 구성	생산수율	거래처명	작성일자
제품명 : ceramide 복합체 분말		1000 Kg	-	-	10 kg * 10 ea	90%	뉴트리	2013.05.30
								제출자 주뉴트리

1. 원재료비						
No.	원재료명	배합비	투입량(Kg)	단가(원/Kg)	금액(원)	거래처
1	ceramide	10.71	117.81	850,000	100,138,500	두산
2	덱스트린	89.29	982.19	3,333	3,273,639	대상
3	발효주정		80	2,606	208,480	
4	정제수		1000			
5						
6						
7						
8						
9						
10						
11						
12						
13						
14						
15						
16						
17						
18						
19						
20						
21						
22						
23						
24						
25						
26						
27						
원재료비계					103,620,619	

3. 직접노무비				
공정명	투입인원	작업시간	공수	금액(원)
관리	1	9	9	180,000
칭량	2	9	9	180,000
포장	2	9	9	180,000
CIP	3	9	9	180,000
노무비 계			36	720,000

4. 제조경비		
항목	산출근거 (원)	금액(원)
감가상각비	(7억/300day/5year/9hr)*2hr	116,666
전기료	190원*70kw*16hr	201,600
시험비	미생물, 기타 시험	50,000
기타비용	경비용 : 15,000원/MH-4hr*4인	240,000
합계		608,266

5. 일반관리비		
항목	산출근거 (원)	금액(원)
일반관리비	(3+4)*12.0%	151,192
물류비		
합계		151,192

6. 이윤		
항목	산출근거 (원)	금액(원)
일반관리비	(3+4+5)*10.0%	142,046

7. 원가 계산			
항목	수요금액(원)	포단위금액(원)	%
원재료비	103,620,619		
부재료비	10,800,000		
노무비	720,000		
제조경비	608,266		
일반관리비	151,192		
소계	115,900,077		
수출	11,590,008		
이윤	142,046		
합계	127,632,131		

2. 부재료비계							
No.	부재료명	단위	Loss(%)	필요수량(ea)	단가(원)	금액(원)	거래처
1	파우치	ea		1000	10,000.00	10,000,000	
2	박스	ea		1000	800	800,000	
3							
4							
5							
6							
7							
부재료비계						10,800,000	

견적사 (VAT별도)	
127,000원 / kg	

[그림 2] 원가 책정 차트

- 발주수량을 1000 kg을 단위로 하여 세라마이드-덱스트린 복합체 분말 kg 당 127,000원의 견적가를 산출하였다.

3. 기존 싸이클로덱스트린(CD)을 활용하여 포접한 복합체와 본 연구로 제조한 전분 나노 복합체간의 효능 및 경제성등을 비교 분석

가. 싸이클로덱스트린(CD)을 활용한 세라마이드 복합체의 제조

싸이클로덱스트린(CD)을 이용한 세라마이드 복합체를 제조하기 위해  $\alpha, \beta, \gamma$  CD를 사용하였다. 복합체 형성방법으로는 교반방법과 Slurry Complexation 방법을 사용하였다.

교반방법은 50°C로 가온한 물에 CD를 용해시키고 세라마이드는 알코올에 용해시킨 후, CD 혼합액을 교반하면서 세라마이드가 용해된 알코올 액을 천천히 섞어 주고 용해된 CD에 세라마이드가 포접될 수 있도록 충분한 시간동안 교반하였다. 충분히 교반한 후, 감압 농축하고 분무건조하였다.

Slurry Complexation 방법은 CD 농도가 50%가 되도록 Slurry를 만들고 세라마이드를 첨가한 후 충분히 교반하고 분무건조하였다..

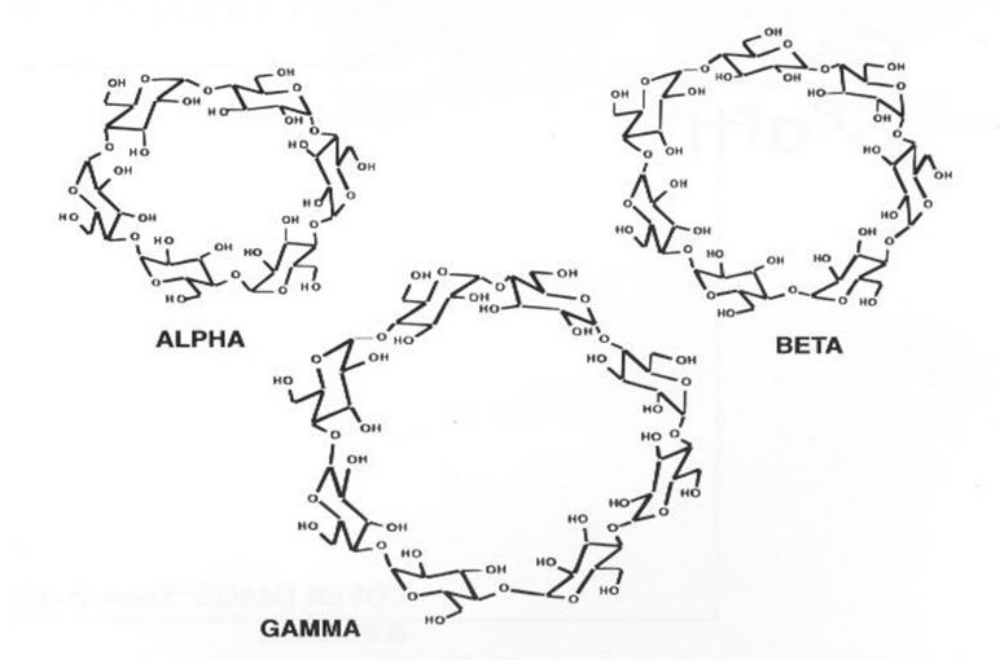
[표 1] 포접방법에 따른 CD와 세라마이드의 양

구분	교반방법			Slurry Complexation 방법		
	$\alpha$ -CD	$\beta$ -CD	$\gamma$ -CD	$\alpha$ -CD	$\beta$ -CD	$\gamma$ -CD
싸이클로덱스트린(g/100ml)	40	5	40	50	50	50
세라마이드(g)	20	2.5	20	25	25	25

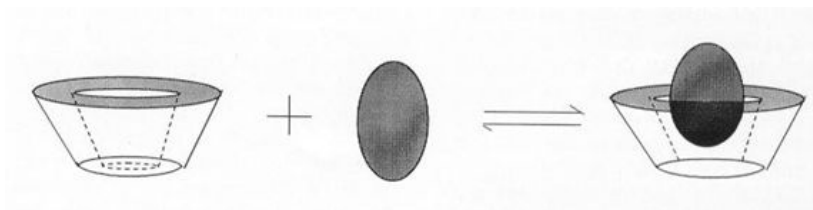
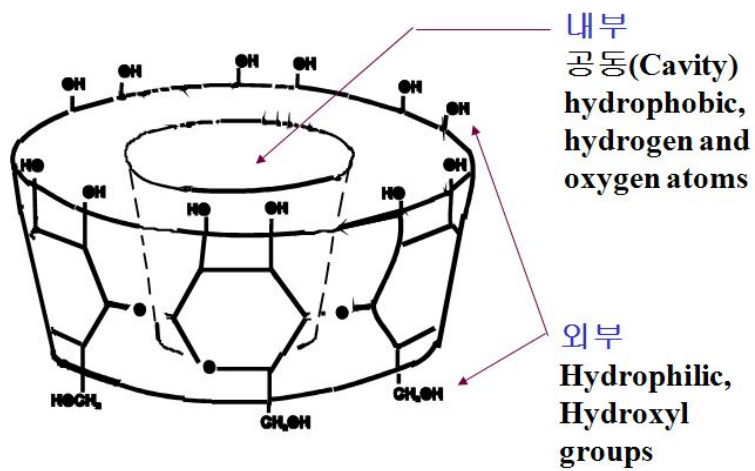
[표 2] Solubility of Cyclodextrin in Water(g/100ml)

온도(°C)	$\alpha$ -CD	$\beta$ -CD	$\gamma$ -CD
0.5	6.8	0.8	9.1
15	8.6	1.35	18.4
20	10.1	1.55	23.2
25	13.0	1.85	30.0
30	16.0	2.25	38.5
40	25.6	3.52	63.5
45	32.3	4.45	77.2
50	43.5	5.62	93.8
60	66.2	9.02	129.2
70	87.6	15.3	163.7
80	109.3	25.3	198.0
90	131.6	39.7	-

자료출처 : Corn Products Korea



[그림 3] 싸이클로덱스트린의 구조



[그림 4] 싸이클로덱스트린 복합체의 구조

나. CD포접 복합체와 나노전분복합체의 효능 비교

CD포접 복합체와 나노전분복합체의 효능은 복합체의 입도와 수용성으로 비교하였다. 복합체의 입도가 작을수록, 수용성이 높을수록 세라마이드의 생체이용률이 증가하므로 입도와 수용성을 비교함으로써 효능을 간접적으로 비교할 수 있다.

85℃ 물을 이용하여 1% 수용액을 만들고 상온으로 방냉한 다음 입도를 분석하고, 침전유무로 수용성을 비교하였다.

[표 3] CD포접 복합체와 나노전분복합체의 입도 및 수용성

구분	나노전분 복합체	교반방법			Slurry Complexation 방법		
		α-CD	β-CD	γ-CD	α-CD	β-CD	γ-CD
평균입도	100 nm 이하	측정불가	측정불가	측정불가	측정불가	측정불가	측정불가
침전유무	무	유	유	유	유	유	유

위 표에서의 결과와 같이 CD포접 복합체는 1% 수용액에서 완전히 용해되지 않고 침전이 발생하고 입도 측정이 불가능 하였다. 이에 반해 나노전분복합체는 물에 완전히 용해되며 평균입도가 100 nm 이하로 나타났다. 이러한 결과로 나노전분복합체의 효능이 CD포접 복합체보다 뛰어나다고 말할 수 있다.

다. CD포접 복합체와 나노전분복합체의 경제성 비교

CD포접 복합체는 수용성이 떨어지고 입도가 커 이용률이 떨어지므로 나노전분복합체가 제품에의 적용성이 우수하고 생체이용률이 높으므로 경제성이 우수하다고 할 수 있다.


4. 시제품 제작

가. 화장품 시제품 제작

- 1차년도에 진행하였던 3종의 화장품보다 세라마이드의 흡수와 기능에 더 적합한 제형을 찾고자 예비 실험을 거쳐 세라마이드의 피부 보습을 가장 발림성이 우수한 상태에서 흡수 시켜주기 위하여 세럼의 형태로 시제품을 제작하였다. 개발된 화장품은 시중에 판매되고 있는 화장품보다 세라마이드의 함량이 약 2~5배 이상 함유되어 세라마이드로서 1%의 함량으로 가진 고세라마이드 화장품으로 개발하였다. 개발된 세라마이드 화장품은 그림 5에 나타내었다.



[그림 5] 세라마이드-텍스트린 복합체를 함유한 세라마이드 세럼

제 D2013050096 조				검사성적서							
검체명	EVERCERAMIDE (Ceramide Moisture Serum)		제조일자 (유통기준)	2012-02-27							
채취인	업체명	에뉴트리	상명	최비희							
	주소	경기 성남시 중원구 삼미원동 190-1 에스케이에테크노파크 테크-1109									
제조번호	20130227	검수년월일	2013-05-03								
검사의뢰목적	광고용	검체접수번호	D2013050096								
<p>이하가 우리 연구원에 검사의뢰한 품목은 다음과 같습니다.      검사원명 총 책임자 : 김 원 희</p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>시험항목</th> <th>결과</th> <th>검사담당자</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>글루코실세라마이드(mg/g)</td> <td>1.05 mg/g</td> <td>이순영</td> </tr> </tbody> </table>						시험항목	결과	검사담당자	글루코실세라마이드(mg/g)	1.05 mg/g	이순영
시험항목	결과	검사담당자									
글루코실세라마이드(mg/g)	1.05 mg/g	이순영									
<p>2013년 5월 10일</p> <p>한국기능식품연구원 </p> <p><small>{사}한국건강기능식품협회 부산 연구기능식품연구부 <a href="http://www.kfsi.re.kr">http://www.kfsi.re.kr</a> 전화번호 051-299-2000 FAX 051-299-0400-1</small></p>											

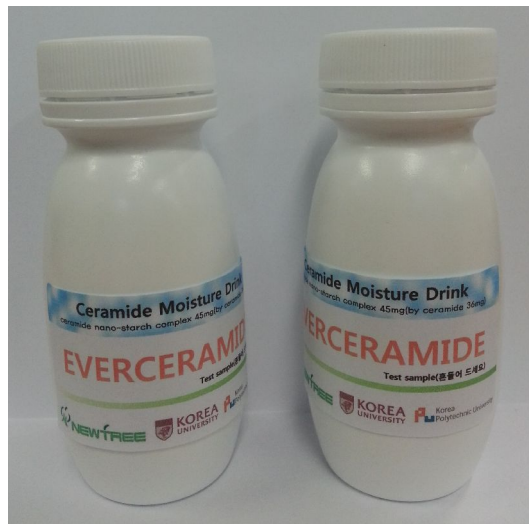
[그림 6] 세라마이드-텍스트린 복합체를 함유한 화장품내의 유효성분 함량 성적서



- 한국기능식품연구원에 의뢰하여 화장품 내의 세라마이드 함량을 분석한 결과, 세라마이드의 함량이 1.05mg/g으로 확인되었다. 이는 세라마이드-덱스트린 복합체 내의 세라마이드 함량을 1%로 기준으로 제조한 결과이며 최종 제품내에 높은 유효성분(ceramide)의 함량을 갖는 것으로 보였다.

#### 나. 음료 시제품 제작

개발된 세라마이드 음료의 용량을 100 mL을 기준으로 제조되었으며 유효성분의 안정성을 더 확보하고자 불투명 용기에 충전하였다. 세라마이드 음료 1병에는 세라마이드 1일 섭취량인 34 mg 보다 많은 36 mg이 함유되도록 세라마이드 복합체를 첨가하였다. 또한 1차년도부터 진행된 배합비 선정 실험에서 가장 최적의 배합비와 기호성으로 선정된 바나나맛의 배합비를 가지고 음료를 제조하였다. 제작된 음료 시제품은 그림 7에 나타내었다.



[그림 7] 세라마이드-덱스트린 복합체를 함유한 세라마이드 음료


제 D2013060095 호      **검 사 성 적 서**

검제품명	EVERCEGRAMIDE DRINK	제조일자 (유통기한)	2012-03-11
의뢰인	업체명	상명	케이피
	주소    김기 성남시 중원구 상대원동 190-1 에스케이엔터프라이즈 테크-1109		
제조번호	D20130311	검수년월일	2013-05-03
검사의뢰목적	광고용	검체접수번호	D2013060095

귀하가 우리 연구원에 검사의뢰한 결과는 다음과 같습니다.      검사관련 총 책임자 : 김 권 피

시험항목	결과	검사담당자
골루코실세라미드(mg/100g)	26.0 mg/100g	이순영

2013년 5월 10일

**한국기능식품연구원** 

(사)한국기능식품연구원의 후원 한국기능식품연구원 <http://www.khfi.re.kr> 전화번호 02-951-3001 FAX(02)958-0400-1

[그림 8] 세라미드-텍스트린 복합체를 함유한 음료 내의 유효성분 함량 성적서

- 한국기능식품연구원에 의뢰하여 음료 내의 세라미드 함량을 분석한 결과, 세라미드의 함량이 36mg/100g으로 확인되었다. 이는 세라미드로서 첨가한 복합체 대비 최종 제품내에 유효성분(세라미드)의 함량이 손실없이 100% 함유되어 있는 것을 확인하였다.

## 5. test-marketing

### 가. 화장품 test-marketing

#### (1) 조사대상 및 방법

제작된 세라미드 화장품 세럼 타입 1종을 가지고 test-marketing을 실시하였다. 제품 사용 후 평가만 진행되었으며 반드시 일주일동안 1회 이상 사용 후 평가를 실시하였다. 대상은 화장품의 큰 구매층을 차지하고 있는 대학생을 선정하였다. 평가는 아래의 설문지 3장으

로 진행하였다(그림 9).

## (2) 조사 결과

참여 인원은 총 50명이며 이 중 여자는 28명, 남자는 22명이 참여하였다. 세라마이드 화장품에서 가장 중요한 보습 지속력에 대한 7점 척도법 물음에서 5.28점의 높은 수치를 보임에 따라 세라마이드 화장품에 대한 피부 보습 기능성을 확인한 참가자들이 많은 것으로 사료된다. 또한 발림성, 밀착력, 흡수력, 끈적임, 성상에 대한 기호도는 보다 세부적인 기호도로 7점 척도법보다는 5점 척도법을 활용하여 평가하였다. 이때 5군에서 모두 PI 3.6 이상의 기호도를 보였다. 자세한 결과를 그림 10에 나타내었다.

또한 구매 희망자는 전체 참여 인원의 58%가 구매 의사를 밝혔으며 그 중 여자는 61%로 남자 55%보다 6%이상 본 제품에 대한 긍정적인 이미지를 보였다. 희망 가격은 기능성 화장품임을 고려하여 평균가 15,800원 이상으로 평가되었다.

2012.03.04

## 세라마이드 화장품에 대한 소비자 조사

품명에 응해 주셔서 대단히 감사합니다.

먼저 조사 방법에 대해 설명 드리겠습니다.

1. 평가 제품은 세라마이드 화장품 1종입니다.
2. 이 제품은 피부보습에 도움을 줄 수 있도록 개발된 기능성 화장품입니다.
3. 평가는 제품 사용 후 평가만 진행됩니다.
4. 제품 사용 평가시에는 기존에 집에서 쓰던 화장품은 사용하지 않아 주세요.
5. 화장품은 반드시 일주일 동안 적어도 하루 한번 이상 사용하고 평가해 주세요.

본 설문지는 2012년 3월 15일까지 제출해 주시기 바랍니다. (평가 기간 월 일 ~ 월 일)

### ● 응답자 표기사항

이름		나이	살	성별	여자( ), 남자( )
현재 사용하는 기능성 화장품					

## 세럼 품평지

다른 제품 평가입니다.

### 세라마이드 화장품 사용 후 평가

Q1. 질문을 읽고 아래 부분에 등그림(○) 표시를 해주세요.

보습 지속력이 어땠나요?			나쁘다면 얼마나 나쁜가요?		
<b>좋다</b> (     ) 화살표 방향 으로 가세요	<b>잘 모르겠다</b> (     ) 멈추세요	<b>나쁘다</b> (     ) 화살표 방향 으로 가세요			
↓			↓		
좋다면 얼마나 좋았나요?			나쁘다면 얼마나 나쁜가요?		
<b>많이 좋다</b> (     )	<b>조금 좋다</b> (     )	<b>잘 모르겠다</b> (     )	<b>많이 나쁘다</b> (     )	<b>조금 나쁘다</b> (     )	<b>잘 모르겠다</b> (     )

Q2. 사용했던 화장품에 대해 하고 싶은 말(좋은 점이나 나쁜 점)을 자유롭게 써주세요.

<b>좋은 점</b>	
<b>나쁜 점</b>	

세럼 품평지

Q3. 사용 후 질문

1) 발림성이 어떻게 느껴졌나요? ( )

- ↑ 1. 매우 잘 퍼발라진다.
- 2. 비교적 잘 퍼발라진다.
- 3. 보통이다.
- ↓ 4. 비교적 퍼발라지지 않는다.
- 5. 전혀 퍼발라지지 않는다.

2) 밀착력이 어땠나요? ( )

- ↑ 1. 매우 잘 밀착된다.
- 2. 비교적 잘 밀착된다.
- 3. 보통이다.
- ↓ 4. 비교적 밀착되지 않는다.
- 5. 전혀 밀착되지 않는다.

3) 피부 흡수력이 좋았나요? ( )

- ↑ 1. 매우 빠르게 흡수된다.
- 2. 비교적 빠르게 흡수된다.
- 3. 보통이다.
- ↓ 4. 비교적 느리게 흡수된다.
- 5. 매우 느리게 흡수된다.

4) 끈적임이 어땠나요? ( )

- ↑ 1. 매우 끈적이지 않는다.
- 2. 비교적 끈적이지 않는다.
- 3. 보통이다.
- ↓ 4. 비교적 끈적인다.
- 5. 매우 끈적인다.

5) 화장품의 성상이 어땠나요? ( )

- ↑ 1. 매우 만족한다.
- 2. 비교적 만족한다.
- 3. 보통이다.
- ↓ 4. 비교적 만족하지 않는다.
- 5. 전혀 만족하지 않는다.

< 종합 평가입니다. >

Q1. 사용하신 제품을 구매하실 의향이 있으십니까?

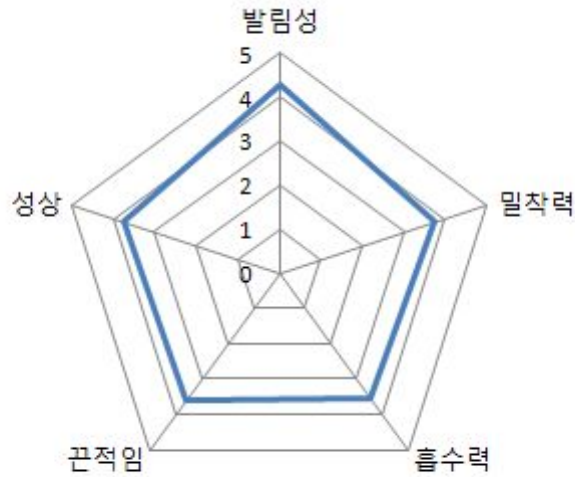
( .....에 , 아니오 )

Q2. 구매하실 의향이 있으시다면 희망 가격은 얼마입니까?

\_\_\_\_\_ 원

< 설문 참여에 감사드립니다. >

[그림 9] 화장품 test-marketing 용 설문지



[그림 10] 세라마이드 화장품 사전 소비자 조사 결과

#### 나. 음료 test-marketing

##### (1) 조사대상 및 방법

세라마이드 음료 바나나 맛 1종을 가지고 test-marketing을 실시하였다. 제품을 시음 전 물로 입을 헹구어 내고 시음을 실시하였으며 시음 후 평가만 진행되었다. 대상은 뷰티음료에 가장 관심이 많은 대학생으로 선정하였다. 평가는 아래의 설문지 4장으로 진행하였다 (그림 11).

##### (2) 조사 결과

참여 인원은 총 126명이며 이 중 여자는 68명, 남자는 58명이 참여하였다. 제작된 음료의 전반적인 기호도는 7점 만점에 5.01점을 받았으며 이 중 여자는 5.13으로 남자의 4.88점보다 더 높은 기호도를 보였다. 또한 음료의 색, 향, 맛, 컨셉에 대한 기호도는 7점 척도법으로 확인할 경우 그 범위가 너무 넓어지는 경향이 있어 5점 척도법으로 평가하였다. 이때 4군에서 모두 3.5점 이상의 높은 기호도를 보였다. 자세한 결과는 그림 12에 나타내었다.

또한 구매 희망자는 전체 참여 인원은 55%가 구매 의사를 밝혔으며 그 중 여자는 59%로 남자의 49%희망자보다 높은 수치를 보였다. 또한 희망 가격은 1,500원/100 mL로 평가되었다.

## 세라마이드 음료에 대한 소비자 조사

불편에 응해 주셔서 대단히 감사합니다.

먼저 조사 방법에 대해 설명 드리겠습니다.

1. 평가 제품은 세라마이드 음료입니다.
2. 이 제품은 피부 보습에 도움을 줄 수 있도록 개발된 기능성 음료입니다.
3. 평가는 제품 시음 후 기호도 평가만 진행됩니다.
4. 물로 입을 헹구어 내시고 시음해주세요.
5. 시음시 음료를 흔들어서 드세요.

본 설문지는 평가 후 바로 제출해 주시기 바랍니다. (평가 기간:        월        일)

### ● 응답자 표기사항

이름		나이	살	성별	여자( ), 남자( )
선호하는 음료					



## 세라마이드 음료 품평지

다른은 제품 평가입니다.

### 세라마이드 음료 시음 후 평가

Q1. 질문을 읽고 아래 부분에 등그라미(O) 표시를 해주세요.

전반적인 기호도가 어땠나요?					
좋다		잘 모르겠다		나쁘다	
(     )		(     )		(     )	
평상시 방향 으로 가세요		평우세요		평상시 방향 으로 가세요	

좋다면 얼마나 좋았나요?			나쁘다면 얼마나 나빴나요?		
많이 좋다	조금 좋다	잘 모르겠다	많이 나쁘다	조금 나쁘다	잘 모르겠다
(     )	(     )	(     )	(     )	(     )	(     )

Q2. 시음했던 음료에 대해 하고 싶은 말(좋은점이나 나쁜점)을 자유롭게 써주세요.

좋은점	
나쁜점	

Q3. 시음 후 질문

1) 음료의 색깔은 어땠나요? ( )

- ↕
1. 매우 좋다.
  2. 약간 좋다.
  3. 좋지 않지도 않다.
  4. 약간 싫다.
  5. 매우 싫다.

2) 음료의 향은 어땠나요? ( )

- ↕
1. 매우 좋다.
  2. 약간 좋다.
  3. 좋지 않지도 않다.
  4. 약간 싫다.
  5. 매우 싫다.

3) 음료의 맛은 어땠나요? ( )

- ↕
1. 매우 좋다.
  2. 약간 좋다.
  3. 좋지 않지도 않다.
  4. 약간 싫다.
  5. 매우 싫다.

4) 음료의 컨셉은 어땠나요? ( )

- ↕
1. 매우 좋다.
  2. 약간 좋다.
  3. 좋지 않지도 않다.
  4. 약간 싫다.
  5. 매우 싫다.

< 세라마이드 음료에 대한 평가가 종료되었습니다. >

< 종료 평가입니다. >

Q1. 뷰티 음료를 시음 하신 적 있으세요?

(        예 , 아니오 )

Q2. 뷰티 음료를 구매 하신 적 있으세요?

(        예 , 아니오 )

Q3. 뷰티 음료를 선호 하세요?

(        예 , 아니오 )

Q4. 평가하신 음료를 구매하실 의향이 있으세요?

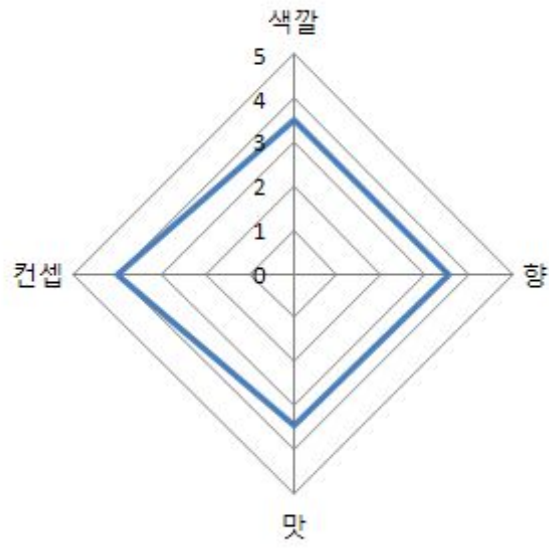
(        예 , 아니오 )

Q5. 구매 하실 의향이 있으시다면 희망 가격은 얼마입니까?

\_\_\_\_\_ 원

< 설문 참여에 감사드립니다. >

[그림 11] 음료 test-marketing용 설문지



[그림 12] 세라마이드 음료 사전 소비자 조사 결과

## 제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

### 1절. 연차별 목표 달성도

#### 1. 1차년도 목표 달성도

구분	세부과제명	세부연구목표	달성도 (%)	연구개발 수행내용
1차 년도 (2010)	○나노전분 복합체의 소개, 음료개발	1. 나노전분복합체 세라마이드 분석 표준화	100	• HPLC를 이용한 세라마이드 분석 방법 확립
		2. 나노 전분 복합체 음료 3종 개발 - PI 3.5/5.0 이상	100	• 나노전분 복합체 음료 3종 제조 - 바나나맛 세라마이드 음료 (PI 3.7/5.0) - 사과맛 세라마이드 음료 (PI 3.6/5.0) - 오미자맛 세라마이드 음료 (PI 3.7/5.0)
	○세라마이드를 이용한 나노전분복합체 제조 기술 확립	3. 나노 전분 복합체 제조기술 확립 - 저장안정성, 액상 상온에서 3개월 이상	100	• Two-phase방식과 batch 방식을 이용한 세라마이드 나노전분 복합체 제조 기술 확립
	○나노 전분 복합체의 안전성 평가	4. 단회투여독성	100	• SD 랫드에 세라마이드 나노복합체를 단회 경구 투여시 시험물질 투여와 관 련된 독성학적 소견이 인정되지 않았 고, 치사량치는 2000 mg/kg B.W이상 임.
		5. 복귀돌연변이(AMES Test)	100	• 세라마이드 나노전분 복합체에 대한 미생물 복귀돌연변이 유발여부 시험결 과, 본 시험 조건하에 사용한 균주들 에 대하여 복귀돌연변이를 유발하지 않았음(음성).
		6. 나노 전분 복합체 안정성 및 저장성 평가 - 산화, 열 등에 대한 안정성 연구	100	• 세라마이드 나노전분 복합체 분말의 유변학적 변화가 나타나지 않음  • 세라마이드 나노전분 복합체 액상의 유변학적 변화가 나타나지 않으며 상 온 3개월 이상의 미생물적 안정성 확 보함.

## 2. 2차년도 목표 달성도

구분	세부과제명	세부연구목표	달성도 (%)	연구개발 수행내용
2차 연도 (2011)	○ 나노 전분 복합체의 이화학적 특성 규명	1. 나노 전분복합체의 물성 및 특성평가  -입자 결정구조, 입자 열전이 특성, 입도 크기 분포, 입자 morphology 등 연구  -다양한 건조방법을 활용한 입자의 영김 방지 효과 분석  -나노 분쇄 및 과쇄에 의한 건조입자의 입도 감소 효과 분석	100	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Batch 방식과 Two-phase 방식을 이용하여 최적의 세라마이드 나노 전분 복합체 제조 기술 확립 (세라마이드를 녹이기 위해 사용된 유기용매의 종류와 양 및 복합체 형성을 위한 반응온도를 달리함).</li> <li>• XRD, DSC, TEM, SEM, DLS 등을 활용하여 복합체의 이화학적 특성을 규명함.</li> <li>• Freeze-drying, vacuum-drying, air-drying 등의 방법으로 입자의 영김정도를 분석함.</li> <li>• 초음파처리에 의한 입자 감소 효과 분석.</li> </ul>
	○ 나노 전분 복합체의 저장성 및 안정성 평가	2. 나노 전분복합체의 저장성 및 안정성 평가  - 저장성 평가  - 안정성 평가	100	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 나노 전분복합체를 액상과 분말 2가지 형태로 나누어 분석하였음 .분말의 경우 시료를 상온에 보관하면서 입도, 표면전하, 색도를 분석하였음 .액상시료인 경우 상온과 4℃에 각각 보관하면서 입도와 표면전하 외에 미생물 테스트를 하였음.</li> <li>• 액상 나노 전분복합체의 pH, 고온, 동결용융에 따른 안정성 정도를 평가하였음.</li> </ul>
	○ 나노 전분 복합체의 생체이용률 평가	3. 혈액 내의 흡수율 평가 (동물실험)  -소화율을 통한 세라마이드 방출 패턴 (In vitro)  -In vivo상에서 혈액 및 세포 내에서의 세라마이드 흡수율 분석  -GC를 활용한 포접물의 방출특성 분석	100	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Pancreatin 효소를 이용하여 37℃에서 24시간 동안 복합체를 가수분해하여 세라마이드의 방출패턴을 관찰함.</li> <li>• SD rat에 복합체를 경구 투여한 다음 시간별로 채혈하여, 혈액 (Serum)내에 존재하는 세라마이드 흡수율을 분석함.</li> <li>• 복합체 내의 세라마이드를 이소프로필알콜로 50℃에서 1 hr 동안 추출한 후 HPLC를 활용하여 방출된 세라마이드의 특성을 분석하였음 . HPLC를 이용한 세라마이드 분석법이 확립되었으므로 이를 통해 GC 분석을 대신함.</li> </ul>

3. 3차년도 목표 달성도

구분	세부과제명	세부연구목표	달성도 (%)	연구개발 수행내용
3차 연도 (2012)	○대량생산 공정 확립	1. 대량생산 공정확립	100	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ 경제적 시스템 개발을 통해 대량 생산 공정을 확립할 수 있었음.</li> <li>▪ 복합체를 함유한 화장품과 음료를 시 생산하여 test-marketing을 실시한 결과, 전반적 기호도가 5점 이상의 높은 점수를 받았음.</li> </ul>
	○ 나노 전분 복합체 제조기술의 표준화	2. 효율적 제조공정 확립 및 수율의 극대화  -다양한 출처 및 구조의 전분 활용  3. 제품의 분산안정성 확립  -이화학적 처리 -검 및 저분자 당 첨가	100	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ 기존의 반응시간을 48시간에서 9시간까지 단축시켰고, 고아밀로즈로부터 유래된 텍스트린뿐만 아니라 천연의 옥수수 전분을 이용하여 수율을 극대화시켰음. 이는 기존의 텍스트린 제조 과정을 요구하지 않아 경제성 있는 제조공정으로 판단됨.</li> <li>▪ 기존의 침전물의 형태로 존재하였던 복합체가 안정한 형태로 분산되어 존재할 수 있는지를 초음파처리 및 다양한 검 (guar gum, xanthan gum)을 활용하여 테스트 해보았음.</li> </ul>
	○ 완제품에 대한 저장안정성 평가	4. 나노 전분 복합체 음료 및 화장품 대한 저장안정성 평가  -저장성 평가 -동결용융안정성 -pH 안정성 -열 안정성	100	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ 세라마이드 복합체가 함유된 음료를 3개월간 4, 25, 40℃에서 보관하며 저장온도에 따른 분산성을 분석함.</li> <li>▪ 세라마이드 복합체가 함유된 화장품 3종(로션, 아이크림, 안티링클밤)을 상온에서 3개월 저장하며 표면균음, 입도, 관능적 성상을 분석함.</li> </ul>

## 제 5 장 연구개발 성과 및 성과활용 계획

### 제 1 절 기술적 성과

- 전분 분자와 세라마이드 분자간의 반응을 최적화하기 위해 batch type 및 two-phase type 의 방식을 적용하여 나노 수준의 평균 입자 크기를 갖는 전분-세라마이드 복합체를 제조 하였음.
- 개발된 최적의 전분복합체 나노화 기술은 불용성 소재의 용해도를 높여줄 뿐만 아니라 동물실험에서 물리적 혼합물에 비해 빠른 흡수율을 보여주었음. 따라서 기능성 식품산업 품질 향상에 큰 영향을 기여할 것으로 사료됨.
- 본 연구에서 개발된 세라마이드 기능성 음료와 화장품은 소비자 조사 결과에서 높은 PI 수치를 보인 것으로 보아 향후 비중이 낮은 소재(예; DHA, 스쿠알렌, CLA등)인 불용성 소재와 융점이 높고, 용해성이 떨어진 원료등의 수용화로 생체 이용률이 극대화 될 수 있는 nanoencapsulation된 기술 개발이 될 수 있으며 식품은 물론, 화장품 더 나아가는 의약품의 DDS(Drug Delivery System)개발에 활용될 수 있을 것으로 사료됨.

### 제 2 절 경제적 성과

- Euromonitor(2002년)에 따르면 전세계 피부미용시장은 4조 5천억정도, 일본시장은 1조 2천억 정도로 추정되며 해마다 가파르게 상승할 것으로 보고했음. 국내 건강미용기능소재로는 히알루론산, 세라마이드, 콜라겐이 대표적인 개별인정형 소재이고 제형과 맛에 대한 한계가 문제로 되어왔음. 또한 2007년부터 서플리먼트용 보다 음료용 시장이 더 커졌고, 일본 특정보건용 히트상품도 음료제품이 주류를 이루고 있음. 위의 결과를 분석해보면, 소비자들의 니즈가 맛있는 건강식품, 편리성에 대한 욕구가 커져 건강식품업체에서 음료제형을 선호했기 때문임. 제형의 어려움이 많았던 세라마이드를 본 연구의 나노복합체기술을 이용하여 물을 포함한 수성용매에 대한 용해성을 높였으며, 넓은 범위의 pH에서 안정하고 가열살균처리 및 동결용융에도 안정하기 때문에 다양한 제형으로 음료, 식품, 화장품, 기능성 식품 및 의약품에 이용이 가능함으로 소비자들이 쉽고, 맛있게 먹을 수 있도록 하여, 건강 기능식품 시장을 활성화 시키는 기폭제가 될 것으로 사료됨.
- 건강기능식품 시장은 2006년 기준으로 2조 3천억원으로 보고되었고, 2013년에는 3조원이상을 상회할 것으로 예상됨. 그 중에서도 기능성음료는 약 1조원이상의 시장을 형성 할 것으로 예상되며, 본 연구팀이 개발한 소재가 차지하는 비중은 20~30% (2,000~3,000억원)는 가능할 것으로 예상함.

### 제 3 절 기타 성과

- 기업차원의 연구인력 활용 방안으로 신규 연구원 채용을 검토 중에 있으며, 저명한 학술대회에 국내외 전문가를 초빙하여, 관련 분야 연구 활동 활성화 및 인프라 구축에 활용함.
- 주관기관 및 참여기관에서는 대학원생들의 연구 참여를 확대하였고, 석박사 학위논문과의 연계를 통해 연구 활동에 깊이를 더하였으며, 더 나아가 본 연구 참여 학생의 동종업계로의 취업을 장려함.



## 제 4절 연구 성과

가. 연구개발결과의 성과 및 활용목표 대비 실적

(1) 연구 성과 목표

(단위 : 건수)

구분	특허		신품종				유전자원 등록	논문		기타
	출원	등록	품종명 명칭등록	품종수 생산 수입 판매 신고	품종보호			SCI	비SCI	
					출원	등록				
1차년도	목표	1						1		
	달성	1						0		
2차년도	목표	1					1			
	달성						0			
3차년도	목표		1				1			
	달성		1				3			
4차년도	목표									
	달성									
5차년도	목표									
	달성									
계	목표	2	1				2	1		
	달성	2	1				3	0		

\* 연차별 연구 성과 목표는 향후 연차평가 등의 정량적 평가지표로 활용됨

나. 논문게재 성과

게재연도	논문명	저자			학술지명	Vol.(No.)	국내외 구분	SCI구분
		주저자	교신저자	공동저자				
2013	Preparation of aqueous dispersion of b-carotene nano-composites through complex formation with starch dextrin	김종예	임승택	서태량	Food Hydrocolloids	33 (256-263)	국외	O
2013	Stabilization of aqueous dispersion of CoQ10 nanoparticles using maize starches	윤한결	임승택	서태량	Food Hydrocolloids	In press	국외	O
2013	Formation of crystalline complexes between amylomaize dextrin and ceramide	김희영	임승택	임재각 김도연	Carbohydrate Polymers	In press	국외	O

다. 특허 성과

(1) 출원된 특허

출원연도	특허명	출원인	출원국	출원번호
2011	친수성이 증가된 텍스트린-세라마이드 복합체 및 이의 제조방법	(주)뉴트리 외 1명	대한민국	10-2011-0039582
2012	텍스트린-세라마이드 복합체 제조방법 및 음료용, 화장품용 조성물	(주)뉴트리	대한민국	10-2012-00-49104

(2) 등록된 특허

등록연도	특허명	등록인	등록국	등록번호
2013	친수성이 증가된 텍스트린-세라마이드 복합체 및 이의 제조방법	(주)뉴트리	대한민국	10-1291813

라. 인력활용/양성 성과

(1) 인력지원 성과

지원 총인원	지원 대상 (학위별, 취득자)				성별		지역별		
	박사	석사	학사	기타	남	여	수도권	대전	기타지역
2		2				2	2		

### 제 5절 성과활용 계획

1. 수출을 위한 전분-세라마이드 복합체 음료 및 화장품 개선
  - 저장안정성 개선 : 상온 2년간 저장안정성 확보
  - 기호성 개선 : 외국인을 대상으로 test-marketing을 시행 후 배합비 개선
  - 제형 개선 : 편의성을 고려한 다양한 형태의 제품 도입
2. 불용성 물질의 수용화에 대한 최적의 복합체 제조 시스템 확보
  - 물질의 특성 및 성분에 따른 맞춤형 제조 시스템 확보
  - 타겟층에 따른 높은 기호성의 기능성 물질 선정 및 데이터베이스 확보
  - 최소량의 사용으로 복합체 형성이 가능한 변성 전분 도입
3. 임상 실험을 통한 효능 및 안정성 검증
  - 인간에 대한 임상 실험을 실시하여 확실한 효능 인증
  - 임상 실험을 통한 안정성 검증

## 제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보

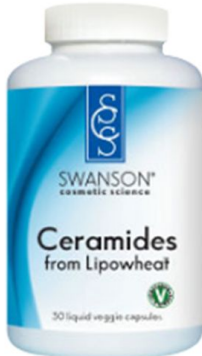
- 최근 미용 드링크 시장에는 높은 가격임에도 세라마이드를 배합한 상품이 증가되고 있다. 현재, 식품용도의 세라마이드 소재는 쌀, 밀, 곤약, 옥수수, 버섯, 비트, 우유, 닭의 껍질, 파인애플 등을 유래로 하는 것 외에 새롭게 나노화된 세라마이드가 합류되고 있다.
- 일본의 시장규모는 2010년에는 약 23억엔으로 향후 2016년에는 25억엔 이상이 전망되고 있다.
- 일본의 시세이도는 ‘글루코실 세라마이드를 관여성분으로 하고, 피부가 건조되기 쉬운분에게 적합하다’는 내용의 청정음료수 ‘스하다(민낫) 워터’를 식품 안전위원회의 신개발 식품 전문 조사회의에 심의한 결과 “계속심의”라는 긍정적인 결과를 얻었다.
- 세라마이드의 기능성 연구동향은 지금까지 경구섭취에 의한 보습, 장벽 기능 향상 작용으로부터 1보 전진하여 경구섭취에 의한 표피 세라마이드량의 증가, 작용 메카니즘의 해명이라는 제 2단계 연구가 추진되고 있다.
- 미국 존웨이 암연구소에서는 세라마이드의 암세포증식의 억제효과를 연구한 결과를 발표하였다. 이 연구에서는 세라마이드는 강력한 종양억제활성을 가지고 있지만, 암 치료에의 적용에는 한계가 있다고 나타냈으며 이것은 세라마이드는 암 세포에 의한 대사가 빠르기 때문에 세라마이드 산생약을 투여하더라도 효능농도에 도달하기 전에 분해되어 버리는 것과 세라마이드 자체의 수용성이 낮기 때문을 문제점으로 지적하였다.
- 일본의 Kao Coporation은 피부와 모발케어를 위해 각층과 모발 세라마이드 분자의 신규 분석 기술을 확립하였으며 천연의 식물 세라마이드가 고가이기 때문에 천연 세라마이드와 같은 보습기능과 장벽 기능을 보충해 줄 수 있는 유사적 세라마이드는 스펅고 리피트 E를 개발해 크림과 같은 화장품 제형에 응용하고 있다.
- 또한, 일본의 소비자청에서는 2012년 11월 세라마이드를 특정보건용 식품의 표시허가에 관한 자문이 실시되었다.
- 세라마이드가 배합된 해외 뷰티 식품



제품명 : Narisup Uruoiya Hiaruronsan Gummi Muscat  
회 사 : Narisup cosmetics  
제조국 : Japan  
가 격 : 6.49\$



제품명 : Narisup Uruoiya Hiaruronsan Jelly Muscat  
회 사 : Narisup cosmetics  
제조국 : Japan  
가 격 : 6.49\$



제품명 : Swanson Ceramides from Lipowheat  
회 사 : Swanson health  
제조국 : United States  
가 격 : 19.99\$



제품명 : Muji Lychee and Konjaku Drink  
회 사 : MUJI  
제조국 : Hong Kong  
가 격 : 1.54\$



제품명 : House Uruoi Syukan Grapefruit aji  
회 사 : House wellness  
제조국 : Japan  
가 격 : 1.95\$

## 제 7 장 참고문헌

1. M. C. Godet, A. Buléon, V. Tran & P. Colonna (1993). Structural features of fatty acid-amylose complexes. *Carbohydrate Polymers*, 21, 91-95.
2. Robyt, J. F., Choe, J. Y., Hahn, R. S., & Fuchs, E. B. (1996). Acid modification of starch granules in alcohols: effect of temperature, acid concentration, and starch concentration. *Carbohydrate Research*, 281, 203-218.
3. Dubois, M., Gilles, K. A., Hamilton, J. K., Rebers, P. A., & Smith, F. (1956). Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Analytical Chemistry*, 28, 350-356.
4. M. C. Godet, H. Bizot & A. Buléon (1995). Crystallization of amylose-fatty acid complexes prepared with different amylose chain lengths, *Carbohydrate Polymers*, 27, 47-52.
5. Rappencker, G. & Zugenmaier, P. (1981). Detailed refinement of the crystal structure of Vh amylose. *Carbohydrate Research*, 89, 182-188.
6. 강병원, Susumu Mitsutake, Takashi okada (2007). 쌀겨 추출물로부터 스펡고당지질의 분리 와 구조결정. *Journal of the Korean Society for Applied Biological Chemistry*, 50(1), 72-76.
7. ASTM, 1985. Zeta potential of colloids in water and waste water. ASTM standard D 4187-82, American Society for Testing and Materials.
8. McNabb TJ, Cremesti AE, Brown PR, Fischl AS (1999). The separation and direct detection of ceramides and sphingoid bases by normal-phase high-performance liquid chromatography and evaporative light-scattering detection. *Analytical Biochemistry*, 276(2), 242-250.
9. A. Buléon, F. Duprat (1984). Single crystals of amylose with a low degree of polymerization. *Carbohydrate Polymers*, 4, 161-173.
10. Brisson, J., Chanzy, H., & Winter, W. T. (1991). The crystal and molecular structure of Vh amylose by electron diffraction analysis. *International Journal of Biological Macromolecules*, 13(1), 31-39.
11. Whittam, M. A., Orford, P. D., Ring, S. G., Clark, S. A., Parker, M. L., Cairns, P. (1989). Aqueous dissolution of crystalline and amorphous amylose-alcohol complexes. *International Journal of Biological Macromolecules*, 11(6), 339-344.
12. Lesmes, U., Cohen, S. H., Shener, Y., & Shimoni, E. (2009). Effects of long chain fatty acid unsaturation on the structure and controlled release properties of amylose complexes. *Food Hydrocolloids*, 23(3), 667-675.
13. R. Cohen, B. Schwartz, I. Peri, & E. Shimoni (2011). Improving bioavailability and stability of genistein by complexation with high-amylose corn starch. *Journal of agricultural and food chemistry*, 59, 7932-7938.

## 주 의

1. 이 보고서는 농림축산식품부에서 시행한 고부가가치식품기술개발사업의 연구보고서입니다.
2. 이 보고서 내용을 발표할 때에는 반드시 농림축산식품부에서 시행한 고부가가치식품기술개발사업의 연구결과임을 밝혀야 합니다.
3. 국가과학기술 기밀유지에 필요한 내용은 대외적으로 발표 또는 공개하여서는 아니 됩니다.